

Introdução

A segurança alimentar tem vindo nestes últimos anos a adquirir enorme relevância no domínio da saúde pública. Os alimentos muitas vezes funcionam como fonte de bactérias causadoras de doença para os animais e pessoas.

A carne de frango, tem nos nossos dias uma grande representatividade na alimentação humana por se tratar de um alimento cujo preço é relativamente baixo, nutricionalmente equilibrado, fácil de confeccionar e de sabor muito agradável. Além do vulgar consumidor, este tipo de alimento também é muito utilizado na alimentação de grupos mais susceptíveis, como sendo idosos, crianças e doentes, o que implica a necessidade de padrões de segurança ainda mais elevados.

Uma das bactérias patogénicas que pode contaminar as carcaças de frango, é *Listeria monocytogenes*, sendo causadora de infecções localizadas e generalizadas, particularmente grave em grupos vulneráveis.

Listeria monocytogenes actualmente é motivo de grande preocupação por estar associada a infecções de origem alimentar, veiculada por vários tipos de alimentos nomeadamente pela carne de frango.

A verdadeira situação nacional quanto à presença de *Listeria monocytogenes* em frango, bem como relativamente aos casos de listeriose associada, é bastante escassa ou inexistente, e para isso, muito contribui o facto de esta doença não ser de declaração obrigatória em Portugal nem existir nenhuma rede de alerta.

Os métodos convencionais para a detecção de *L. monocytogenes* nos alimentos obrigam a trabalho intensivo e moroso, (Rodriguez-Lázaro, Jofré, Aymerich, Hugas & Pla, 2004), o que levou à procura de novas metodologias mais rápidas e mais sensíveis, onde se incluem metodologias moleculares como a reacção em cadeia da polimerase (PCR).

Perante a importância sócio-económica que representa a carne de aves, em particular a de frango, e pelo facto de não existirem dados recentes respeitantes ao grau de contaminação da carne de frango por *L.monocytogenes*, foi objectivo primordial deste trabalho fazer essa avaliação em amostras de peito de frango provenientes de um matadouro industrial e em simultâneo validar a metodologia alternativa baseada em PCR utilizada para a detecção de *L.monocytogenes*.

O trabalho é constituído por uma revisão bibliográfica, em que é referida a importância do sector avícola mundial e nacional, perspectivas futuras deste sector, e o abate como factor importante da qualidade microbiológica das carcaças. Faz-se também uma abordagem acerca da bactéria *Listeria monocytogenes*, da doença por ela causada e dos riscos associados aos alimentos. Por fim descrevem-se as

diferentes metodologias passíveis de detectar esta bactéria em alimentos, bem como as dificuldades inerentes às matrizes alimentares.

O trabalho experimental foi dividido em dois grupos. Num primeiro grupo determinou-se o teor de Enterobacteriaceae, como factor adicional de avaliação higio-sanitário das amostras, tendo em conta o dia de abate, o sistema de produção e a exploração de origem dos diferentes bandos. Descrevem-se os métodos utilizados e discutem-se os resultados obtidos, com a finalidade de se detectar ou não relação entre as variáveis descritas anteriormente e as contagens de Enterobacteriaceae.

O segundo grupo foi dividido em dois sub-grupos, um primeiro em que se avalia a sensibilidade da metodologia molecular da reacção em cadeia da polimerase (PCR) adoptada para este trabalho na detecção de *Listeria monocytogenes*, inoculando-se para isso amostras de peito de frango e um segundo sub-grupo em que é avaliada a presença de *Listeria monocytogenes* em amostras de peito de frango colhidas em matadouro industrial, através da metodologia clássica e em simultâneo pela utilização de PCR. Discutem-se os resultados, a metodologia e fazem-se as comparações com os resultados obtidos por outros autores. Por último, descrevem-se as conclusões finais e as perspectivas futuras.

Revisão bibliográfica

1. Importância do sector avícola mundial e nacional. Perspectivas de futuro

Existe consenso por parte de consumidores, médicos e nutricionistas, de que a carne de aves é mais saudável que a carne vermelha por conter menos gordura saturada, apontada actualmente como a grande responsável por problemas cardíacos. Ao contrário de outras carnes, a carne de aves possui níveis reduzidos de gordura intramuscular, estando a maior parte da gordura localizada subcutaneamente e por isso fácil de remover (Alvarado, 2006; Meira, 2002). Além de saudável, é um alimento altamente nutritivo. Cem gramas de carne de peito sem pele contêm apenas 110 kcal e 23 gramas de proteína, e com esta quantidade o consumidor satisfaz 46% de suas necessidades diárias de proteína (Meira, 2002). A carne de frango é barata relativamente às restantes, atributo fundamental no momento da compra. As características nutricionais e tecnológicas da carne de aves fazem com que seja uma ótima opção para a alimentação de grupos populacionais de risco, tais como idosos, doentes, crianças e grávidas.

O aumento do consumo deste tipo de carne deve-se à evolução da tecnologia e à integração da produção de forma vertical, que diversificou a oferta de forma criativa conseguindo chegar a mais segmentos de mercado, expandindo assim a produção e aumentando a importância do sector e os respectivos lucros (Lima, 2008a), estimando-se que continue a aumentar dada a ótima relação preço / qualidade / produto saudável (Lima, 2008b).

A indústria avícola deixou de fornecer apenas carcaças inteiras para consumo doméstico, para começar a desmanchar as aves e vender sob diferentes apresentações, embaladas em atmosfera modificada quer para o mercado doméstico quer para exportação (Lues, Theron, Venter & Rasephei, 2007). Consequentemente, o sector avícola aumentou a taxa de produção tendo para isso recorrido à mecanização completa e automatização da linha de abate; em muitos casos os matadouros conseguem abater 12.000 aves por hora (Göksoy, Kirkan & Kök, 2004).

Além dos factores nutricionais, baixo custo e diversificada oferta referidos anteriormente, temos o factor segurança, continuando os consumidores europeus a confiar na carne de aves (AVEC, 2008).

O consumo de carne de frango tem aumentado consideravelmente ao longo dos últimos 40 anos, apresentando em 2005 a nível mundial um valor médio de 12,4 kg/habitante nos Estados Unidos da América, enquanto na Europa no mesmo ano o consumo médio foi de 23,2 kg/habitante. Este período foi acompanhado pelo aumento

do nº de aves abatidas a nível dos principais países produtores de aves (GPP, 2008). Em Portugal, a produção de aves de capoeira registou um crescimento sustentado nas últimas duas décadas, em volume e em valor (GPP, 2008), apesar das dificuldades e riscos que enfrenta. O sector avícola tem mantido uma dinâmica apreciável, tornando-se competitivo a nível europeu e assegurando 95% do fornecimento de carne e ovos do país (Lima, 2008b; Soares, 2008).

O consumo de carne de aves no nosso país, foi afectado em 2003 pela crise dos nitrofuranos (decreceu 12,7%). Após esta crise, a produção de aves cresceu 7% no ano de 2004 (de 208 652 em 2003 para 222 737 em 2004) e 1,5% em 2005 (Tabela 1) (GPP, 2008). Mais tarde em 2005 foi afectada pela gripe aviária, que embora não tendo sido registado qualquer caso nacional, teve um impacto negativo no consumidor. As frequentes notícias relativas à gripe das aves desde Outubro de 2005 na Europa, levaram a uma quebra no consumo e nos preços da carne de aves obrigando a indústria avícola nacional a reduzir a oferta de forma a tentar equilibrar o mercado, tomando medidas restritivas de produção e provocando a sua diminuição em 2006 (INE, 2006).

Meses	Ano (toneladas)				
	2001	2002	2003	2004	2005
Janeiro	16 311	17 468	16 923	15 882	15 082
Fevereiro	19 771	18 489	18 238	18 614	16 981
Março	18 150	19 559	18 284	18 705	17 142
Abril	21 538	19 625	16 111	17661	17 581
Maio	20 957	20 291	15 289	20467	18 526
Junho	23 111	21 649	16 461	20829	19 518
Julho	21 756	20 958	17 814	18902	20 719
Agosto	21 465	20 688	19 418	18062	19 579
Setembro	23 474	21 211	19 066	19312	20 511
Outubro	19 251	20 418	17 160	18596	19 810
Novembro	19 941	20 201	17 501	19330	20 917
Dezembro	17 267	18 561	16 387	16377	19 707
Total	242 992	239 118	208 652	222 737	226 073

Tabela 1: Produção da carne de frango (toneladas) registada entre 2001 e 2005 (adaptado de GPP, 2008).

As fortes medidas de combate e vigilância da gripe aviária empreendidas por Portugal e o seu controlo a nível europeu e mundial, fizeram com que o consumidor voltasse a ganhar confiança neste alimento, observando-se uma tendência crescente de consumo reflectida no aumento do número de aves abatidas nos anos de 2006 a

2008 (Tabela 2). Em 2008, observa-se um aumento da produção e do abate de aves, quando comparado com o ano anterior (INE, 2008).

A produção de carne de frango em Agosto de 2008 registou um aumento de 8,1% (22,1 mil toneladas) relativamente à produção no mês homólogo de 2007 (INE, 2008).

Frangos de carne	Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Set	Out	Nov	Dez	Total
Cabeças	2006	12210	10522	13105	11204	12605	13074	13415	15683	13142	13411	12767	154192
1000 n°	2007	13856	11792	13140	12846	14257	13570	15303	16845	15143	14005	13328	167677
	2008	14706	13398	13581	15023	14617	17096						

Tabela 2: Frangos de carne abatidos e aprovados para consumo público em Portugal nos anos de 2006, 2007 e 2008 (adaptado de INE, 2008).

A integração vertical da produção, a qual significa que a mesma empresa ou grupo económico possuem várias ou a totalidade das etapas produtivas que vão desde a produção do pinto até ao produto final pronto a ser consumido, tem permitido uma uniformização da produção e um aumento das margens de lucro (Alvarado, 2006).

Portugal tem que dispôr de políticas estruturais que garantam a sua competitividade em mercado aberto, interna e externamente. As políticas de crescente liberalismo do mercado com exigências desiguais relativamente a países concorrentes fora do espaço comunitário como o Brasil, EUA, Chile, Argentina e Tailândia, podem causar perdas de rendimento importantes no espaço Europeu e em Portugal (Lima, 2008c). Ainda este ano, a União Europeia (UE) corre o risco de perder a sua auto-suficiência no sector da carne das aves. A produção no espaço comunitário obriga a produções responsáveis, cumpridoras de legislação exigente ao nível de licenciamento, do bem-estar animal, da sanidade e da higiene, com responsabilidade social o que encarece a produção relativamente a países terceiros onde estas obrigações não existem. Sabemos, que actualmente o principal factor de decisão do consumidor é o preço, e os operadores da moderna distribuição pressionam a indústria avícola a baixar o preço ou então recorrem à importação de carne de países como o Brasil, Tailândia ou Chile (Lima, 2008b). Nan Dirk Mulder, perspectiva que o consumo de carne de aves continuará a aumentar nos próximos anos, mas com quebras de resultados financeiros na UE, devido ao aumento dos custos de produção (AVEC, 2008). O saldo da balança comercial (Figura 1) apresenta valores negativos, com um défice médio de 29 milhões de euros, que aumentou 130% de 2000 até 2007 e com aumento das importações em 94% (em volume) essencialmente no subsector

da carne de peru. O valor mais elevado dos últimos oito anos, 46,4 milhões de euros, registou-se em 2007 (Lima, 2008a).

O futuro da produção avícola nacional e europeia passa pela garantia, por parte das autoridades, da sustentabilidade do sector, através de preços de mercado competitivos, garantia da saúde pública e em simultâneo pela exigência, a todos os intervenientes no mercado, de respeito pelas mesmas regras no exercício da actividade (Lima, 2008a).

O sector avícola não conseguirá fornecer por mais tempo aos consumidores europeus carne de aves alimentadas com matérias-primas importadas e os consumidores irão ser confrontados com carne importada, de aves que foram alimentadas com variedades de organismos geneticamente modificados (OGM) não autorizados na UE (AVEC, 2008).

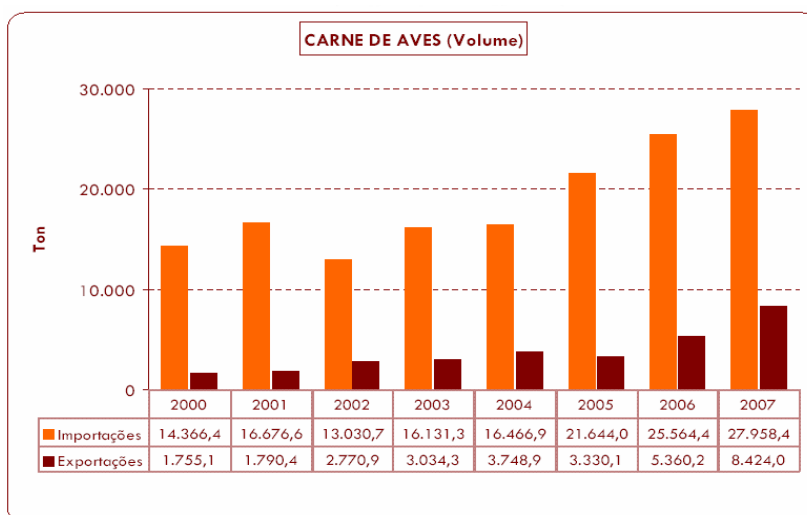


Figura 1: Evolução da balança de pagamentos no sector da carne das aves, em volume (adaptado de GPP, 2008).

2. Sistemas de produção de aves

O “frango biológico” é um sistema de produção cujas aves têm acesso a espaço ao ar livre sempre que as condições meteorológicas o permitam, sendo necessária uma área exterior de 4 m²/frango de engorda (não excedendo o limite de 170 kg/ de N/ ha/ ano, em que N corresponde a cabeças normais e é igual a 0,013 para frangos). O efectivo não pode ultrapassar as 4800 frangos e os 10 animais/m² de área interior com um máximo de 21 kg de peso vivo/m² de pavilhão. A idade de instalação dos

pintos não pode ultrapassar os 3 dias e a de abate não pode ser num período inferior a 81 dias (Socampestre, 2004; Regulamento CE n.º 889/2008).

O “frango do campo”, denominação comercial do frango produzido em regime extensivo, é criado ao ar livre, alimentado com rações com um mínimo de 70% de cereais sendo a produção e o abate controlados de forma específica pelas autoridades. Os pavilhões têm uma área de 200 m² e uma área de 2 m²/frango. O que distingue o “frango do campo” do frango industrial é a alimentação, mas também o tempo de vida: os primeiros são abatidos ao fim de 81 dias de criação, enquanto os outros ao fim de 38-40 dias (Socampestre, 2004).

3. Abate e desmancha de frango

A operação de abate, contempla todas as etapas que vão desde a chegada das aves ao matadouro até à carcaça ou parte dela estar pronta a sair para a distribuição. O processo de abate de aves é determinante na qualidade final da carne pois cada etapa tem enorme influência nas suas características higiénicas e tecnológicas. Assim, um bom entendimento do processo pode ser de extrema importância para um abate bem sucedido do qual resultem carcaças e derivados de altíssima qualidade.

Este processo pode ser dividido em várias etapas (Veloso, 2007).

3.1. Período que antecede o abate

3.1.1. Jejum

As aves devem deixar de ter acesso ao alimento cerca de 8 -12 horas antes do abate, mas mantendo-se disponível a água. O impedimento do acesso à alimentação antes do abate irá provocar o esvaziamento do conteúdo intestinal, o que diminui a quantidade de fezes excretadas durante o transporte, reduz as excreções fecais *ante mortem* e reduz a contaminação transversal fecal durante a evisceração, evitando assim que ocorra contaminação pelo conteúdo fecal das carcaças, água do escaldão, depenadoras e ainda do pavimento das jaulas (Hinton, Buhr & Ingram, 2000; Veloso, 2007).

Se o jejum for inferior a 8 horas, facilmente poderá ocorrer ruptura do intestino durante a evisceração com consequente conspurcação das carcaças por bactérias causadoras de infeções de origem alimentar tais como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* (Cox, Bailey & Berran, 1997) presentes na matéria fecal destes animais. Por outro lado se o jejum ocorrer durante um período muito longo, podem surgir consequências negativas em termos de qualidade do produto final

sendo que a partir da sexta hora de jejum se verificam perdas de 0,2 a 0,5 % do peso da carcaça por cada hora excedente, devido a catabolização do tecido corporal (Veerkamp, 1978).

Uma das defesas das aves contra a colonização do tubo digestivo por bactérias patogénicas, é o pH baixo, a presença de microflora bacteriana nativa produtora de ácido láctico e produção de ácidos gordos com actividade anti-bacteriana. O jejum vai remover os hidratos de carbono fermentáveis de que as bactérias produtoras de ácido láctico necessitam para o seu crescimento e produção de ácido. O jejum causa assim uma diminuição na população das bactérias produtoras de ácido láctico e um aumento no pH intestinal. O baixo pH produzido pelos subprodutos metabólicos destas bactérias foi associado à inibição do crescimento de *Escherichia coli*. Durante o jejum, há por isso uma redução da capacidade de inibir o crescimento de Enterobacteriaceae o que permite uma estabilização ou um aumento do número de *Salmonella* e outras Enterobacteriaceae, e assim se o período de jejum for prolongado, podem aumentar as bactérias patogénicas (Hinton *et al.*, 2000).

3.1.2. Captura

A apanha das aves deve ocorrer durante o período de jejum, tendo presente que esta etapa pode ter grande influência na qualidade da carne bem como no aspecto da carcaça no final do processo de abate. O stress resultante da apanha das aves é um factor determinante de qualidade da carne e por isso ela deverá ser rápida, agrupando-se o lote e sendo efectuada pelos apanhadores com as duas mãos de modo a abranger o dorso e as asas do frango. Os traumatismos também podem ser consequência desta etapa e correspondem a 20% a 30% da totalidade das rejeições *post mortem* (Alvarado, 2006; Veloso, 2007).

3.1.3. Transporte

O transporte desde a exploração até ao matadouro, e a sua influência sobre os animais depende do tipo de condução, da distância a percorrer, do horário em que é feito e do número de aves por jaula, bem como do número de filas de jaulas. Todos estes factores têm implicações importantes nas carcaças e na carne com perdas qualitativas e quantitativas (Warriss, Bevis, Brown & Edwards, 1992; Nijdam, Arens, Lambooij, Decuypere & Stegeman, 2004). O dimensionamento das unidades de transporte é dada em função do peso dos animais a transportar (Tabela 3), de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1/2005 do Conselho, de 22 de Dezembro de 2004,

relativo à protecção dos animais durante o transporte e operações afins e que altera as Directivas 64/432/CEE e 93/119/CE e o Regulamento (CE) n.º 1255/97.

O transporte deve acontecer durante a madrugada, o que assegura temperaturas mais baixas e assim redução do stress pelo calor. Quanto maior a distância a percorrer durante o transporte das aves, maiores taxas de mortalidade serão esperadas e menor será a qualidade da carne (Warriss *et al.*, 1992; Alvarado, 2006).

Categoria	Área em cm²*
Pintos do dia	21 — 25 por pinto
Aves de capoeira que não sejam pintos do dia:	Área em cm² por kg*
<1,6 kg	180 — 200
1,6 a 3 kg	160
3 a 5 kg	115
> 5 kg	105

*Estes valores podem variar em função não só do peso e do tamanho das aves de capoeira, mas também do seu estado físico, das condições meteorológicas e da duração provável da viagem.

Tabela 3: Áreas mínimas de chão e densidades aplicáveis ao transporte de aves de capoeira em contentor, de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1/2005.

Durante o transporte, o stress causado leva a alterações dos padrões de excreção dos portadores de *Salmonella*, através da alteração da função intestinal (Davies & Board, 1998).

3.1.4. Repouso e Descarga

O repouso deverá ser de algumas horas, as quais são contabilizadas no período de jejum. Durante este tempo, as aves podem ser pesadas e determinados alguns parâmetros tais como peso médio e desvio relativamente ao peso médio das aves com a mesma idade, sendo estimado o índice de conversão do bando o qual pode ajudar a avaliar o manejo produtivo e a existência de doenças no bando. Um repouso insuficiente pode conduzir a dificuldades na depena por contracção do foliculo da pena (Veloso, 2007).

Depois da chegada ao matadouro, as jaulas com as aves devem ser colocadas em local protegido das condições climatéricas adversas e com ventilação adequada para recuperarem do stress associado ao transporte. O período que decorre entre a

introdução da primeira ave na jaula (na exploração) e a retirada da última ave da jaula (no matadouro) deve ter a duração máxima de doze horas. As jaulas podem ser descarregadas de forma automatizada ou manual (geralmente em perus), ambos os métodos podem originar ferimentos e traumatismos ósseos se a manipulação não for a correcta (Fraqueza, 2006; Veloso, 2007).

3.2. Abate

3.2.1. Dependura

O abate inicia-se com a dependura (Figura 2) das aves pelos metatarsos nos ganchos da linha de abate (Veloso, 2007). Durante este período as aves debatem-se violentamente pois trata-se de uma postura fisiologicamente anormal para aves que causa compressão dos metatarsos pelo metal e é extremamente doloroso induzindo o batimento das asas, o que pode conduzir a fracturas ósseas e luxações (EFSA, 2004). O batimento das asas desaparece em doze segundos nas galinhas e em vinte segundos nos perus e está relacionado com o stress e desconforto que provoca na ave, por estar dependurada.



Figura 2: Dependura de frangos no início da linha de abate.

Este processo é geralmente realizado em local escuro, com luz violeta ou negra que tem efeito calmante nas aves, reduzindo o stress (Alvarado, 2006). A dependura não deve ultrapassar a duração de um minuto (Veloso, 2007).

3.2.2. Insensibilização

Um dos métodos utilizados na insensibilização das aves é a electronarcose em tanque de água, no fundo do qual são colocados eléctrodos em toda a extensão (Veloso, 2007). Na União Europeia é obrigatório a aplicação de uma descarga eléctrica que provoque insensibilização até que ao momento da sangria (Lambooi, Reimert, Van de Vis & Gerritzen, 2008). A intensidade e a duração da corrente eléctrica utilizada é determinada pelo Instituto de Protecção da Produção Agro-Alimentar (IPPA), de modo a garantir que o animal atinja imediatamente um estado de inconsciência que dure até à sua morte. O eléctrodo imerso na água deve ser do comprimento do tanque e, quando se empregam 50 Hz de corrente alternativa sinusoidal, os níveis mínimos de corrente devem ser igual a 120 mA para Broilers (Decreto-Lei nº 28/96 de 2 de Abril). As aves entram no tanque de cabeça para baixo, ficam imersas até à base das asas com as cabeças próximas dos eléctrodos. Os tanques de imersão para aves de capoeira devem possuir uma dimensão e profundidade adequadas ao tipo de ave a abater e não devem deixar transbordar água à entrada (Decreto-Lei nº 28/96 de 2 de Abril). Uma amperagem elevada como a que a EU obriga, pode provocar fracturas, hemorragias sobretudo nos músculos peitorais, rotura da artéria femoral e outros danos. Quando a intensidade de corrente é muito baixa pode ser suficiente para imobilizar o animal, mas pode não impedir que as aves percepcionem a dor, o stress e o desconforto. Além disso, a sangria não ocorre totalmente, sendo a carne resultante de baixa qualidade, e as aves podem recuperar a consciência antes de morrerem (Alvarado, 2006).

Lambooi *et al.* (2008), determinaram que pode haver insensibilização efectiva das aves se for aplicada uma corrente de 111 mA durante um segundo num banho onde a cabeça é imersa e colocado outro eléctrodo metálico que vai penetrar na cloaca.

3.2.3. Sangria

Logo após a insensibilização deve ocorrer a sangria, realizada através da secção de ambas as artérias carótidas para que a morte cerebral ocorra de imediato (Veloso, 2007). O uso do corte unilateral (que atinge apenas uma artéria carótida e a veia jugular) conduz a uma taxa de sangramento mais lenta, a um início tardio da morte e a níveis mais elevados de contaminação bacteriana interna dos sacos aéreos durante a imersão no escaldão, comparativamente à sangria obtida por corte bilateral (Buhr, Berrang, Cason & Bourassa, 2005).

A electronarcore causa um aumento da pressão sanguínea levando a hemorragias caso a sangria não se efectue de imediato (William, Hagstad, Spangler, Hinton & Hughes, 1996).

As carótidas podem ser seccionadas por faca automática (Veloso, 2007) ou manualmente (Figura 3). Os animais perdem 30 a 50% da totalidade do sangue (Wilson, 2005) a partir destes grandes vasos, ocorrendo paragem cerebral e morte. O volume de sangue perdido corresponde entre 3 a 4 % do peso vivo do animal. Se a sangria não for suficiente teremos deficiências qualitativas na carne, alteração da cor da carcaça e da pele durante o escaldão e grande alteração do sabor por depósitos de sangue nos músculos (Alvarado, 2006).



Figura 3: Exemplo de sangria manual em frangos de produção extensiva.

3.2.4. Escaldão

Para que ocorra a remoção das penas, as aves são submetidas a um escaldão com água quente, que está dependente de duas variáveis, tempo e temperatura, determinantes para a qualidade do produto final e que devem ser regulados de acordo com a idade das aves e tipo de conservação pelo frio a que vão ser sujeitas. A água quente deve atingir o folículo, abrindo-o e de modo a facilitar a depena (Alvarado, 2006; Veloso, 2007).

Quando a temperatura do escaldão é muito elevada origina desprendimento da epiderme durante a depena e inutiliza a gordura sub – cutânea provocando adesão entre a pele e o músculo subjacente conferindo um aspecto manchado e de

cozimento superficial dos músculos peitorais o que leva à rejeição das carcaças no exame *post mortem* (Veloso, 2007).

O escaldão de frangos cujas penas são mais fáceis de remover e que se destinam a ser refrigerados em tunel de ar, é feito com água a uma temperatura de 50 a 54°C durante cento e vinte segundos, condições suficientes para remover as penas e não causar danos na camada externa da pele ou cutícula (Alvarado, 2006). Por outro lado, em galinhas e perus cujas penas estão fortemente inseridas nos folículos e nos frangos que se destinam à congelação, a temperatura do escaldão deverá ser superior a 55°C; o binómio tempo temperatura pode ser de 61-63°C durante quarenta e cinco segundos (William *et al.*, 1996; Alvarado, 2006; Veloso, 2007).

No escaldão são frequentes as contaminações cruzadas por água conspurcada com fezes presentes nas patas, pele e penas e com sangue porque a temperatura que a água atinge não é suficiente para eliminar os microrganismos veiculados (Davies & Board, 1998; Veloso, 2007). Esta contaminação pode ser por microrganismos patogénicos e não patogénicos causadores da decomposição das carcaças.

A minimização das contaminações poderá obter-se através da lavagem das carcaças depois da depena e da manutenção da água do escaldão limpa (Veloso, 2007). O teor de microrganismos aeróbios totais presentes na água do escaldão pode variar entre 10^2 e 10^3 ufc/ml (Cunningham, 1982 citado por Fraqueza, 2006b). A água do escaldão pode reduzir significativamente a carga microbiana das carcaças se for continuamente substituída por água limpa (Göksoy *et al.*, 2004), se ao invés disso, for mudada apenas uma vez por dia pode fazer aumentar a contaminação total em 8 log ufc/g levando a que o produto final tenha contagens de 6,6 log ufc/g (Abu-Rwaida *et al.*, 2004 citado por Göksoy *et al.*, 2004). Esta operação pode ainda favorecer as bactérias resistentes ao calor e as formadoras de esporos (McNamara, 1997 citado por Göksoy *et al.*, 2004).

Pelo exposto, têm sido estudadas várias alternativas ao escaldão por imersão. Veerkamp & Hofmans (citado por Davies & Board, 1998) efectuaram o escaldão usando “spray” de água quente seguido da depena, e obtiveram reduções nos teores de bactérias relativamente ao método convencional. Contudo este método nunca foi implementado comercialmente, pois a depena não era eficiente.

O escaldão em contra – corrente tende a ter maior impacto na reduções nos teores bacterianos da carcaça (McNamara, 1997 citado por Göksoy *et al.*, 2004), embora comercialmente esta alteração também pareça improvável, pois há sempre uma mistura da água o que dispersa as bactérias por todo o tanque. Waldroup *et al.*

(1992 citado por Davies & Board, 1998) não encontraram diferenças entre o escaldão realizado em contra corrente, e o método convencional em termos de teores bacterianos do produto final.

Outra alteração implementada relativamente ao escaldão convencional foi a divisão do tanque em vários pequenos sub-tanques, com ou sem re-circulação de água. A vantagem deste sistema em cascata deve-se ao facto de se conseguir realmente um sistema em contra – corrente entre a água e as carcaças, o qual dá origem a teores microbianos mais reduzidos. Um abaixamento do pH através da utilização de ácidos orgânicos poderá ser útil em termos de redução do teor bacteriano das carcaças mas pode provocar alterações organolépticas do produto final (Davies & Board, 1998), não é no entanto permitido na União Europeia.

3.2.5. Depena

A operação de depena foi automatizada há já vários anos (Davies & Board, 1998). A boa remoção das penas da carcaça é feita através da rotação de dedeiras de borracha da depenedora e depende do escaldão que a antecede, do tempo de permanência da carcaça na depenedora e da velocidade de rotação das dedeiras (Alvarado, 2006). Se excessiva, a depena pode causar perdas e mutilações da carcaça e se insuficiente pode não remover a totalidade das penas (William, Hagstad, Spangler, Hinton & Hughes, 1996; Davies & Board, 1998; Fraqueza, 2006b; Alvarado, 2006). As penas que não são removidas de forma automática, devem sê-lo manualmente (William *et al.*, 1996).

Esta etapa tem sido considerada a grande responsável por contaminações cruzadas (Göksoy *et al.*, 2004). Este facto deve-se às dedeiras poderem facilmente ser conspurcadas e à persistência de biofilmes, pelo que devem ser submetidas a lavagem e desinfecção diárias (Fraqueza, 2006b; Veloso, 2007). A depena de uma ave contaminada pode levar a contaminações cruzadas das aves que são depenadas a seguir (Mulder *et al.*, 1997, citado por Davies & Board, 1998).

Depois da depena as aves devem ser lavadas para reduzir o teor microbiano da sua superfície. A primeira inspecção *post mortem* acontece nesta zona (Wilson, 2005).

Para garantir a elevada qualidade higiénica da carne, o parâmetro mais importante da depena está dependente da uniformização das aves e do ajuste do equipamento. Assim, se não existir este ajuste do equipamento ao tamanho das aves ou se o tamanho das carcaças variar muito, podem aumentar as mutilações e as perdas de

qualidade (Alvarado, 2006). Esta premissa também se aplica às restantes etapas do abate.

3.2.6. Corte das cabeças e das patas

Esta etapa pode ou não existir (Figura 4), e na maioria das aves de capoeira é eliminada a cabeça pela articulação occipito – atlóideia e as patas ao nível do tarso (Wilson, 2005; Veloso, 2007).



Figura 4: Carcaças de frango após o corte da cabeça pela articulação occipito – atlóideia e das patas ao nível do tarso.

3.2.7. Evisceração

A remoção das vísceras é normalmente automática, mas pode ser manual (Figura 5). Em ambos os métodos, depois de aberta a cavidade toracoabdominal, as vísceras são expostas e removidas (Alvarado, 2006). As carcaças e seus órgãos são inspeccionados após esta fase (Veloso, 2007).

A presença de vísceras na carcaça contribui para a rápida degradação da mesma, principalmente os pulmões que possuem elevada carga microbiana em consequência da aspiração da água do escaldão (Veloso, 2007), no entanto existem vários estudos que indicam que esta etapa não reduz significativamente os teores microbianos (Göksoy *et al.*, 2004).

A lavagem por aspersão após a evisceração contribui para uma redução do teor microbiano das carcaças, no que respeita aos microrganismos não aderentes à pele, a água utilizada tem que ser potável (Fraqueza, 2006b).



Figura 5: Exemplo de evisceração manual de frangos.

3.2.8. Arrefecimento rápido das carcaças e refrigeração

Durante a refrigeração das carcaças, pretende-se que a temperatura dos músculos peitorais desça para 4°C mas a rapidez do arrefecimento depende do tamanho das aves (Veloso, 2007; Alvarado, 2006). O método de refrigeração também influencia este tempo de arrefecimento, e a refrigeração pode ser feita por imersão (método mais frequente nos EUA) ou por ar frio (método vulgarmente utilizado em Portugal, resto da Europa, América do Sul e Canadá).

Em Portugal, tal como na Europa, as aves depois da evisceração e lavagem entram num túnel de ar frio, onde permanecem o tempo necessário a uma temperatura que pode ir de -1°C até 2°C, por este método pode haver também pulverização das carcaças o que ajuda a diminuir a temperatura e as perdas por evaporação. As carcaças arrefecidas por ar frio ficam com um aspecto seco mas que desaparece após re – hidratação, contudo têm geralmente menor carga microbiana e maior tempo de validade quando comparadas com as arrefecidas por imersão (Alvarado, 2006).

A legislação Europeia estabelece que a temperatura da carne fresca deve ser igual ou inferior a 4°C, e quanto mais próxima do ponto de congelação da água mais se contraria o crescimento bacteriano (Ayres, 1960, citado por Cox *et al.*, 1998). Para que haja inibição máxima do crescimento bacteriano, a temperatura deveria situar-se

entre -2°C e -1°C, mas corresponde ao início da congelação e por isso não é praticável (Roseiro, 1999, citado por Fraqueza, 2006).

Até serem refrigeradas, as carcaças permanecem com os folículos das penas abertos, onde se vão acumular microrganismos, que aí ficam aprisionados aquando da refrigeração por fecho desses mesmos folículos, dificultando a remoção dos microrganismos por lavagem e ou desinfecção, esta ultima não permitida na União Europeia (Fraqueza, 2006).

3.2.9. Desmancha e embalagem

Depois de reduzida e estabilizada a temperatura das carcaças, elas são acondicionadas ou são penduradas em grilhões e desmanchadas sendo depois embaladas. No primeiro caso em que o frango se destina a ser comercializado inteiro, já na sala de embalagem, podem ser adicionadas à carcaça as vísceras comestíveis (moela, fígado e coração) e as patas acondicionadas em sacos de plástico e o conjunto é depois pré-embalado e pré-refrigerado. Posteriormente as carcaças devem ser acondicionadas na embalagem, normalmente caixas de plástico ou papelão, com padronização do peso total.

Por outro lado, pode ser efectuada desmancha da carcaça, que é depois vendida em partes, o que traz valor acrescentado a este tipo de produto. Nestes casos a carcaça pode ser refrigerada durante oito a doze horas a 4°C. Este período permite reverter a tenrura inicial. Depois de maturada, a carcaça pode ser desmanchada de forma manual ou automática, e em ambos os casos os peitos, as asas e os membros são separados da restante carcaça. O peito de frango é a parte mais cara, e uma vez que esta peça é depurada de pele, qualquer alteração é mais facilmente percebida pelo consumidor (Alvarado, 2006).

Os peitos de frango obtidos são depois embalados em embalagem de atmosfera modificada (MAP), em que temos uma embalagem cujo ar é removido por vácuo ou por “flushing” e depois ocorre preenchimento com uma mistura de gases, seguido de selagem da embalagem. A composição da mistura altera-se com o tempo de armazenamento como resultado do metabolismo bacteriano, absorção de gases pelo produto e difusão através da película da embalagem (Rao & Sachindra, 2002 citado por Nollet & Toldrá, 2006).

Verificou-se que em carne fatiada de peru embalada em atmosfera com 50% de CO₂ *L. monocytogenes* é inibida a 0°C e 7°C, mas esta inibição não acontece para temperaturas abusivas (Fraqueza, Ferreira & Barreto, 2006a)

4. Contaminação das carcaças durante o abate e desmancha

As aves que chegam ao matadouro estão geralmente contaminadas com bactérias patogénicas para o Homem.

Os teores bacterianos de carcaças recentemente processadas são influenciados pela duração do jejum que antecede o abate, transporte, duração do período entre a chegada ao matadouro e o abate, controlo das temperaturas do interior das instalações e do ar exterior, etapas do abate e boas práticas de higiene (Göksoy *et al.*, 2004).

Hidromel (1989), citado por Göksoy *et al.*, (2004) definiu as razões pelas quais o controlo de microrganismos nos locais de abate de aves é difícil: 1) a velocidade elevada da linha de abate mantém as aves com grande proximidade durante todo o processamento; 2) limitações do equipamento usado para o escaldão, depena e evisceração; 3) dificuldade de lavar a cavidade toracoabdominal eficazmente após a evisceração quando a carcaça permanece inteira; 4) retenção de água pela pele, que transporta as bactérias para as fendas cutâneas e folículos das penas, embora estes últimos pareçam ter uma contribuição menor (Buhr *et al.*, 2003, citado por Cason, Hinton & Buhr, 2004).

As diferentes estações do ano, nas quais ocorrem diferentes amplitudes térmicas, parecem influenciar a flora bacteriana do frango, a qual nas estações mais quentes aparece aumentada (Cohen, Ennaji, Hassar & Karib, 2007).

Os bandos de frangos têm teores baixos ou nulos de *Listeria monocytogenes*, que se mantêm baixos nas primeiras etapas do abate (Berrang, Lyon, Smith & Northcutt, 2000). Contudo, como geralmente as explorações avícolas não são inspeccionadas quanto à existência de *Listeria monocytogenes*, podem estar na origem da contaminação dos matadouros e salas de desmancha (Esteban, Oporto, Aduriz, Juste & Hurtado, 2007).

Ao longo de toda a linha de abate pode haver contaminação das carcaças com bactérias patogénicas (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus*) e bactérias responsáveis pela decomposição das carcaças (*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter*, *Alteromonas*, etc.) que podem ser transportadas nas patas, penas e intestinos (Göksoy *et al.*, 2004).

A contaminação das carcaças pode ocorrer através do contacto com as superfícies (equipamento), a água do escaldão e aerossóis (Göksoy *et al.*, 2004; Veloso, 2007). Embora a fonte desta contaminação ainda não esteja totalmente esclarecida, parece que ocorre essencialmente nas últimas fases do processamento

das carcaças (Cox *et al.*, 1997; Barbalho, Almeida, Almeida & Hofer, 2005). A contaminação das carcaças por *Listeria monocytogenes* pode acontecer durante ou depois do escaldão, na depenadora por contaminação cruzada, o que advém do facto de não ser possível detectar a presença deste agente patogénico através do acto inspectivo (Cox *et al.*, 1997; Barbalho *et al.*, 2005). Depois de um animal infectado entrar no matadouro, vai contaminar os instrumentos e toda a linha de abate, o que posteriormente levará à contaminação das um elevado número de carcaças abatidas em seguida (Cox *et al.*, 1997).

Nos matadouros de aves *Listeria monocytogenes*, já foi isolada das superfícies de aço inoxidável, material de transporte, puxadores das portas, utensílios de limpeza, luvas dos manipuladores e água de lavagem. Esta frequência demonstra que existe contaminação a partir das próprias instalações, como por exemplo através dos aerossóis produzidos durante a lavagem, não sendo *Listeria monocytogenes* eliminada pela limpeza e desinfecção e conseguindo sobreviver durante longos períodos em condições desfavoráveis (Lawrence & Gilmour, 1994). Geralmente, o aumento da manipulação das carcaças faz aumentar os teores de *Listeria* spp. e de *Listeria monocytogenes* (Lawrence & Gilmour, 1994).

Como possível causa de sobrevivência e persistência de *Listeria monocytogenes*, temos a aderência desta bactéria às superfícies que contactam com os alimentos após um contacto de apenas vinte segundos (Lawrence & Gilmour, 1994). As bactérias podem formar microcolónias dinâmicas que podem mais tarde originar biofilmes, os quais posteriormente contaminarão os alimentos que contactarem com estas superfícies. A formação de biofilmes pode conferir protecção às bactérias e permitir-lhes resistir melhor à limpeza e desinfecção, sendo assim focos de contaminação para os alimentos (Lawrence & Gilmour, 1994). Embora existam vários estudos sobre os contaminantes microbianos associados às várias etapas do abate e desmancha de carcaças de aves de capoeira, poucos investigaram a qualidade do ar nestes locais (Rylander, Hsieh & Courteheuse 1994; Whyte *et al.*, 2001, citados por Lues *et al.*, 2007). Os estabelecimentos de abate e desmancha de aves de capoeira estão predispostos a contaminação do seu ar interno o qual vai veicular microrganismos para as superfícies, equipamento, e mãos dos trabalhadores (Whyte, 2002, citado por Lues *et al.*, 2007). Além disso, o ar tem um papel significativo na transmissão dos micróbios patogénicos e pode mesmo ser implicado na contaminação de carne de aves de capoeira nas várias etapas do abate e do processamento das carcaças (Geornaras *et al.*, 1996, citado por Lues *et al.*, 2007).

A potencial contaminação de alimentos e doenças de origem alimentar por aerossóis que contêm microrganismos precisa de ser melhor estudada. As contagens microbianas demonstram um padrão similar na predominância dos vários microrganismos nas diferentes etapas do processamento. Existe um declínio definitivo nos números bacterianos desde a área de recepção e sangria para a área de expedição. A área de refrigeração tem as contagens microbianas mais baixas. A elevada predominância de microrganismos nas zonas de recepção, atordoamento e sangria é atribuída ao batimento das asas e aos movimentos das aves que contribuem para que os microrganismos se dissipem por via aérea. Os níveis médios de *L. monocytogenes* transportados por via aérea nas áreas de recepção e sangria, depena e evisceração obtidos por Lues *et al.* (2007) foram de $9,3 \times 10^3$, $3,9 \times 10^3$, e $2,5 \times 10^3$ ufc/m³, respectivamente.

As contagens elevadas dos microrganismos transportados por via aérea observados na zona de recepção, sangria e depena enfatizam a importância do controlo a este nível da laboração. Nos locais de abate e processamento de aves, os micróbios patogénicos cuja existência é conhecida devem ser reduzidos para níveis mínimos de forma a limitar o seu transporte a partir das áreas fortemente contaminadas para as áreas a jusante, onde há uma maior exposição das carcaças à contaminação por via aérea e por contacto com as superfícies. As carcaças de aves estão sujeitas a contaminação e os cuidados não devem visar apenas a limpeza das superfícies e desinfecção dos utensílios, mas também a diminuição ou eliminação da contaminação microbiana pelo ar (Lues *et al.*, 2007).

Durante as operações de desmancha de carcaças as contaminações cruzadas são inevitáveis quer por contacto com o equipamento, quer através dos manipuladores (Fraqueza, 2006b).

5. Bactérias causadoras de infecções de origem alimentar

Uma infecção de origem alimentar resulta da ingestão de um agente patogénico seguido de crescimento no hospedeiro. Os principais processos patológicos deste tipo são causados por (Prescott, Harley & Klein, 2002):

- *Salmonella*, resultado da ingestão de diversos serovares, em particular o Typhimurium e o Enteritidis, que geralmente causam sintomas de gastroenterite oito horas após a ingestão de alimentos contaminados.
- *Campylobacter jejuni* é responsável por um grande número de gastroenterites agudas em indivíduos de diferentes idades.

- *Listeria monocytogenes*, geralmente causadora de doença em grupos de risco, cujos sintomas e períodos de incubação são variáveis.
- *Escherichia coli*, bactéria causadora de diarreia no Homem .

Nas últimas décadas, *Salmonella* tem estado na origem da maioria dos casos de infecções alimentares, geralmente resultantes da ingestão de ovos, carne de aves de capoeira e outras carnes, leite cru e chocolate. No entanto, a frequência de infecções por *Campylobacter jejuni* tem aumentado de tal modo nos últimos anos que, nalguns países, chega a rivalizar com *Salmonella*. Embora ainda com baixa expressão, o aparecimento de casos de infecções por *Listeria monocytogenes* nas últimas décadas tem trazido preocupações, pois esta bactéria pode provocar danos severos ou mesmo fatais em bebés, crianças, mulheres grávidas, idosos e indivíduos imunodeprimidos (INSA, 2008).

As intoxicações provocadas por *Yersinia enterocolitica* e por algumas estirpes de *Escherichia coli* têm-se tornado frequentes nos últimos anos, embora existam outras bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, ou *Bacillus cereus*, implicadas em intoxicações alimentares (INSA, 2008).

Relativamente à toxinfecção de origem bacteriana, é por definição, doença provocada por toxinas produzidas por baterias, verifica-se que existem quatro agentes que mais frequentemente são responsabilizados por toxinfecção colectiva: *Clostridium perfringens*, *S. aureus* e *Campylobacter* (INSA, 2008).

5.1. Enterobacteriaceae

A quantificação de Enterobacteriaceae permitirá avaliar a contaminação de origem intestinal durante o processo de abate e os seus teores não devem ser superiores a 10^4 ufc/g ou então 10^3 ufc/cm² (Mossel, 1995). A principal fonte de contaminação por estas bactérias parecem ser as superfícies e instrumentos de trabalho contaminados (Nychas & Drosinos, 1999).

Enterobacteriaceae, é uma família de bactérias Gram-negativas, bacilos, fermentadores da glicose, oxidase negativos, com capacidade de reduzir os nitratos a nitritos, catalase positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, com flagelos peritricos ou então imóveis e de distribuição ubiqutária (Nychas & Drosinos, 1999; Prescott *et al.*, 2002).

As principais bactérias deste grupo que podem estar presentes em frangos são, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphy, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braaki*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter*

cloacae, *Serratia marcescens*, *Providencia alcalifaciens*, *Edwardsiella* e *Yersinia* spp (Nychas & Drosinos, 1999).

5.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, bactéria do género *Listeria* foi descoberta em 1926 por E.G.D.Murray (Cossart, 2007). Caracteriza-se por ser ubiquitária, Gram positiva, movimentar-se por flagelos e anaérobica facultativa (FDA, 1992; Liu, 2007; Chaturongakul, Raengpradub, Wiedmann & Boor, 2008).

O género *Listeria* é formado por seis espécies *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. grayi* e *L. innocua*, baseado na homologia do DNA, homologia do 16S rRNA, propriedades quimiotaxicas e análise enzimática (McLauchlin, Mitchell, Smerdon, Jewell, 2004; Rebuffo, Schmitt, Wenning, Stetten & Scherer, 2005). Apenas as espécies hemolíticas provocam doença, sendo representadas pela *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri* e *Listeria ivanovii* (IFT, 2004). No entanto, só a primeira pode de facto ser considerada patogénica para o Homem, (Cossart, 2007; EFSA, 2007a; IFT, 2004). *Listeria ivanovii* está associada essencialmente a doença nos animais (Cossart, 2007), particularmente em ruminantes onde ocasionalmente pode provocar aborto (ovelhas e vacas) ou septicémia (ovelhas) (Orndorff, Hamrick, Smoak & Havell, 2006). As outras espécies de *Listeria*, não estão geralmente associadas a doença (OIE, 2005).

Esta bactéria pode desenvolver-se em ambientes extremos de pH (5 – 9,6), e resiste a congelação e descongelação repetidas (Liu, 2007; IFT, 2004; Herenda & Franco, 1996). Toleram bem a presença de NaCl, a desidratação e variações de osmolaridade (IFT, 2004; Liu, 2007). Conseguem tolerar temperaturas várias o que lhes permite resistir ao calor, mas também a baixas temperaturas incluindo as de refrigeração existentes em inúmeros ambientes tecnológicos de produção de géneros alimentícios (EFSA, 2007; Liu, 2007).

Listeria monocytogenes pode ser encontrada em diversas fontes ambientais (FDA, 1992; OIE, 2005; Barocci *et al.*, 2007). Os grandes reservatórios deste agente de infecção são o solo, a silagem, o tracto gastro-intestinal de animais assintomáticos, nomeadamente mamíferos domésticos e silvestres, aves, peixes e crustáceos, e ainda fetos abortados e ocasionalmente nas descargas nasais e urina de animais doentes (OIE, 2005; FDA, 1992). Alguns estudos mostram que 1 a 10% da população humana é portadora de *Listeria monocytogenes* a nível intestinal (FDA, 1992).

A espécie *Listeria monocytogenes* inclui treze serovares, que se distinguem pelos carboidratos de superfície e antígenos flagelares (Orndorff *et al.*, 2006; López,

Suárez, Chico-Calero, Navas & Martínez-Suárez, 2006). Os serovares 4b, 1/2a e 1/2b são os agentes isolados na maioria dos casos de doença no animal e no Homem (Chaturongakul, Raengpradub, Wiedmann & Boor, 2008; López *et al.*, 2006; OIE, 2005). Eles são responsáveis por mais de 90% das infecções em humanos, e são também os mais frequentes em géneros alimentícios e locais de processamento de alimentos (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

As estirpes do serovar 4b são a causa predominante de surtos e de alguns casos de listeriose. Existem estirpes de outros serovares que não o 4b que causaram surtos graves, como por exemplo o serovar 1/2a na Alemanha (279 casos) e o serovar 3a na Finlândia (15 casos) (McLauchlin *et al.*, 2004). Os casos esporádicos são causados pelos mesmos serovares, mas a frequência do serovar 4b é menor que a do serovar 1/2a e 1/2b (López *et al.*, 2008).

Nos alimentos não associados a listeriose os serovares 1/2a e 1/2b predominam. As estirpes do serovar 4b poderão ter menor capacidade de formar biofilmes nas instalações de transformação dos produtos alimentares quando comparada com a do serovar 1/2, o que explica a menor prevalência daquele serovar. Contudo, a diferente distribuição dos serovares parece não estar, aparentemente, relacionada com a existência de algum tipo de vantagem do serovar 1/2a quando comparado com o 4b em meios selectivos habitualmente usados na cultura destas bactérias (López *et al.*, 2006).

O serovar 4b além de ser o principal responsável pela listeriose, é também mais isolado em pacientes com meningoencefalite do que em pacientes com infecção sistémica, o que pode indicar que é mais virulento que os restantes. Associado a este facto está também a maior taxa de mortalidade registada associada ao serovar 4 (26%) relativamente ao serovar 1/2 (16%). A base molecular destas diferenças ainda não está determinada (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

As estirpes do serovar 4b de *Listeria monocytogenes* são geneticamente muito semelhantes entre si e o número de estirpes pertencentes a este seróvar, em diferentes países e nos últimos 20 anos, é muito pequeno. Uma estirpe do serótipo 4b isolada na Áustria no ano de 2000 era idêntica a uma outra também epidémica isolada nos Estados Unidos em 1985 (López *et al.*, 2008).

Listeria monocytogenes tem o seu genoma codificado para mais de 209 reguladores de transcrição (só a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* tem mais do que ela) o que reflecte a sua capacidade para sobreviver e multiplicar-se em ambientes muito diferentes. Um gene deste tipo que está bem estudado é o *prfA*, o qual regula a

expressão de diversos genes pertencentes ao grupo responsável pela virulência das espécies do género *Listeria* (Liu, Ainsworth, Frank, Austin & Lawrence, 2004).

Embora *Listeria monocytogenes* seja considerada patogénica, existem estirpes com diferentes graus de virulência. Algumas estirpes de *Listeria monocytogenes* são capazes de causar doença ou morte, mas outras há cujo potencial patogénico é pequeno e são relativamente avirulentas (Liu, Ainsworth, Austin & Lawrence, 2003; McLauchlin *et al.*, 2004; López *et al.*, 2008). No caso da listeriose humana, o procedimento habitual de pesquisa e contagem de *L. monocytogenes* é claramente insuficiente porque não permite diferenciar as estirpes virulentas das não virulentas, que provavelmente são maioritárias, mais importante ainda por se tratar de uma bactéria ubiqüitária amplamente distribuída no meio ambiente (López, 2006).

A sequenciação, em 2001, do genoma completo de *L. monocytogenes* e a sua comparação com o genoma de *L. innocua* revelou que 10% dos genes são diferentes entre a espécie patogénica e a não patogénica. Posteriormente, compararam os genomas de diferentes serovares de *L. monocytogenes* (1/2a e 4b) o que permitiu identificar genes específicos dos serovares e 8% das sequências são específicas do sorovar 4b, diferença semelhante à que existe entre *L. monocytogenes* e *L. innocua*. Dos 484 genes regulados durante o crescimento intracelular de *Listeria* spp., 41 são específicos de *L. monocytogenes*, mas também existem 25 genes específicos do sorovar 1/2a que não está presente no genoma sequenciado do sorovar 4b. Estes resultados poderiam explicar o potencial de virulência do sorovar 4b. A diversidade genética que existe entre alguns serovares de *L. monocytogenes* é tão grande como a que existe entre algumas espécies de *Listeria* (López *et al.*, 2008).

A capacidade de diferenciar as estirpes verdadeiramente virulentas das restantes poderia evitar a eliminação injustificada de alimentos e prevenir surtos de doença. Os métodos desenvolvidos para determinar a virulência de *Listeria monocytogenes* incluem métodos *in vivo* e métodos *in vitro*. Os primeiros através dos efeitos em ratos e os segundos pelos efeitos citopatogénicos em linhagem de enterócitos Caco-2 ou em embriões de galinhas (Liu *et al.*, 2004).

Liu *et al.* (2004) estudaram a correlação entre os resultados *in vivo* e por PCR quanto à virulência de diferentes estirpes de *Listeria monocytogenes*. Utilizaram para isso oito “primers” diferentes derivados de um painel de oito genes (quatro codificam factores de transcrição, dois codificam proteínas com função desconhecida e dois codificam uma internalina) de *L. monocytogenes* em doze estirpes virulentas e um painel maior que incluía amostras do meio ambiente, alimentares e clínicas e determinaram que as estirpes virulentas de *Listeria monocytogenes* contêm genes

que podem potencialmente ser utilizados para as diferenciar de estirpes não virulentas. Existe correlação entre ambas as metodologias, o DNA das estirpes virulentas para o rato sofreu amplificação pelo PCR relativamente a pelo menos dois dos “primers” utilizados e o DNA das avirulentas (ATCC19114 e HCC25) não sofreu amplificação. Os oligonucleótidos derivados do gene *lmo2821* (que codifica para a internalina) permitiram identificar todas as estirpes virulentas testadas.

Algumas estirpes de *L. monocytogenes* expressam uma forma não funcional de internalina. As estirpes de origem clínica expressam a internalina completa com maior frequência (96%) que as estirpes isoladas em alimentos (65%). Dos quatro serovares que se isolam com maior frequência, o serovar 4b (que está associado a um maior número de surtos de listeriose humana) e o serovar 1/2b expressam sempre a internalina completa. Contrariamente a estes, o serovar 1/2a fá-lo de forma variável e o serovar 1/2c (raramente responsável por casos de listeriose humana) expressa sempre a forma truncada da internalina. A expressão da internalina pode ser um bom marcador de virulência de *L. monocytogenes* em humanos, o que permitá avaliar os riscos de listeriose em função não só dos níveis de contaminação mas também da funcionalidade da internalina (López *et al.*, 2008).

A hemolisina, deleções no gene *actA*, defeitos na expressão ou na função da proteína ActA também parece influenciar a virulência de *L. monocytogenes* (López *et al.*, 2008).

A regulação e a expressão dos numerosos factores de virulência de *L. monocytogenes*, a diversidade genética bacteriana e o grau de susceptibilidade da população humana torna muito difícil a diferenciação inequívoca entre estirpes virulentas de estirpes não virulentas de *L. monocytogenes*. A atenuação da virulência de *L. monocytogenes* deve-se a diversos mecanismos e por isso é pouco provável que um único método baseado em técnicas moleculares, culturas celulares ou ensaios em animais permita diferenciar os isolamentos com diferentes graus de patogenicidade. A longo prazo, será possível identificar determinados aminoácidos fundamentais para a correcta actividade das proteínas associada à virulência, o que permitirá a detecção das mutações responsáveis através de métodos mais sensíveis, como o “PCR multiplex” (López *et al.*, 2008).

Actualmente, a legislação e a Organização Mundial de Saúde (OMS) não fazem ainda distinção de estirpes, referindo-se à espécie como um todo, quando mencionam os riscos associados aos diferentes tipos de alimentos.

6. Listeriose nos animais

A Listeriose nos animais está mais associada a problemas de segurança alimentar do que a perdas a nível de produção (Orndorff *et al.*, 2006). Esta doença de origem alimentar afecta várias espécies de animais e tem geralmente três formas de evolução clínica, sépticemia, aborto e doença neurológica (Rissi *et al.*, 2006). Aparece na forma de doença clínica em ovinos (Figura 6) e bovinos, cujas manifestações são encefalite, aborto e septicémia (OIE, 2005). Em frangos, geralmente não está associada a sintomas nem a quebras de produção, mas torna-os portadores capazes de eliminar o agente através das fezes e sendo por isso fontes de infecção para os locais de abate e manipulação de aves (Cox *et al.*, 1997). A doença clínica nas aves é rara e ocorre sobretudo nos jovens na forma de septicémia (OIE, 2005; Rissi *et al.*, 2006).

Os ruminantes geralmente infectam-se quando consomem silagem contaminada por *L. monocytogenes*. Muitas vezes o processo de fermentação que está na origem da silagem, não baixa suficientemente o pH de modo a prevenir o sobrecrecimento desta bactéria ubiqüitária (Orndorff *et al.*, 2006; Rissi *et al.*, 2006). No caso de recém-nascidos, a transmissão da infecção é geralmente vertical (OIE, 2005). O período de



Figura 6: Manifestações neurológicas associadas à listeriose em ovinos (adaptado de Vazquez – Boland *et al.*, 2001)

incubação para a encefalite dos ruminantes é de dez dias a três semanas. Septicémia e aborto podem ocorrer depois de um ou mais dias (OIE, 2005). Existem algumas evidências indicativas de que a encefalite nas ovelhas pode ser adquirida através de cicatrizes nas raízes dos dentes ou com outras localizações na mucosa oral, que leva a uma neurite, especialmente do nervo trigémino, resultando em lesão cerebral, não está no entanto estabelecido que haja paralelismo no Homem (McLauchlin *et al.*, 2004).

Listeria monocytogenes tem sido isolada em diversos países membros da União Europeia de animais de produção, que geralmente se infectam através dos alimentos,

água e animais silvestres tais como aves e ratos. A Tabela 4 mostra a frequência de *Listeria monocytogenes* em animais de produção em alguns países da Europa (WHO, 2004).

Em 2003, treze países membros referenciaram casos de *Listeria* spp. e de *Listeria monocytogenes* em animais, a maioria localizados na Alemanha. Foi encontrada em diferentes espécies de animais de produção sendo mais frequente em ruminantes (EFSA, 2006). A frequência em frangos, registada em apenas quatro países, é baixa, tal como se pode observar na Tabela 5.

<i>Listeria monocytogenes</i>			
País	Espécie afectada	Nº de casos	Frequência (%)
Alemanha	Vacas leiteiras (exploração)	1246	7
	Vacas de carne (exploração)	14	21
	Ovinos e caprinos (exploração)	648	11
Itália	Ovinos e caprinos (animais)	110	26
Portugal	Ovinos e caprinos (animais)	46	11
Finlândia	Porcos (animais)	188	2

Tabela 4: Frequência de *Listeria monocytogenes* em animais de produção de alguns países da União Europeia referente ao ano de 1998. (adaptado de WHO, 2004).

O diagnóstico pode ser feito através de isolamento de *Listeria monocytogenes* na placenta, feto e descarga uterina após aborto, no sangue e líquido cefalorraquidiano de animais com septicemia ou encefalite, fígado, baço e rins em animais com septicemia e ainda pons e medula para casos de encefalite. Nas fezes e no leite, *Listeria monocytogenes* pode ser isolada mesmo em animais que não estão doentes (OIE, 2005). Além do isolamento, podem ser utilizados testes rápidos para identificação baseados nos caracteres bioquímicos e reacções enzimáticas e ainda através de ELISA (“enzyme-linked-immuno-sorbent assay”), imunofluorescência, imunocromatografia, separação imunomagnética e PCR. Das provas referidas anteriormente, as serológicas não são vulgarmente utilizadas, pois muitos animais

saudáveis possuem títulos elevados de anticorpos para *Listeria* e pode haver reacção cruzada com *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus* e outros microrganismos (OIE, 2005).

<i>Gallus gallus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	
	Nº de Animais Testados	% de positivos
República Checa	131	0
Alemanha	2170	0,2
Irlanda	397	0
Lituânia	42	4,8

Tabela 5: Frequência de *Listeria monocytogenes* em frangos em alguns países da União Europeia (adaptado de EFSA, 2007).

Nas aves com septicémia as lesões *post mortem* são: necrose, degenerescência do miocárdio e pericardite serofibrinosa. Pode haver também petéquias no pró-ventrículo e coração e ainda esplenomegália, hepatomegália, retenção de biliar e necrose focal hepática. As lesões da forma encefálica não são detectáveis macroscopicamente (OIE, 2005).

7. Listeriose Humana

7.1. Generalidades

A listeriose é geralmente um problema grave em mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e imunodeprimidos, (Figura 7) que pode ser fatal (OIE, 2005) e cujos sinais são inespecíficos. Além do impacto económico e da ameaça associada com os surtos, a listeriose representa um problema importante de saúde pública, devido à sua taxa de mortalidade entre as mais altas de todas as infecções transmitidas por alimentos (20-30%), e ao seu alto potencial epidémico. A evolução dos métodos de produção dos alimentos, tal como a distribuição e o armazenamento, facilitaram a ocorrência de surtos afectando numerosos países (Valk *et al.*, 2005).

A fonte de contaminação humana mais importante é a ingestão de alimentos contaminados (OIE, 2005; EFSA, 2007), com relevância para a carne e o peixe não ou insuficientemente cozinhados, leite não pasteurizado e seus derivados, vegetais crus, e também refeições processadas que foram contaminadas após esse mesmo

processamento (OIE, 2005). Para além da ingestão, a infecção pode também acontecer por contacto directo animal infectado – Homem (assistência ao parto, necrópsia, contacto com aves doentes e carcaças que estavam saudáveis em vida), Homem infectado – Homem, e também por inalação e transmissão venérea (OIE, 2005; EFSA, 2007). No caso de recém nascidos, a infecção é geralmente vertical e *Listeria monocytogenes* é transmitida ao feto por via transplacentária ou então aquando do nascimento, por infecção do canal cervical materno (OIE, 2005).

O período de incubação da listeriose é variável, enquanto em adultos pertencentes aos grupos de risco pode ser de 3 a 70 dias (o valor médio é de 3 semanas), nos recém-nascidos infectados durante o nascimento, temos sinais clínicos poucos dias a algumas semanas depois. A gastroenterite febril, que ocorre em pessoas saudáveis tem um período de incubação de 1 a 2 dias (OIE, 2005; Decisão da Comissão 2008/426/CE).

A dose infectante efectiva está dependente da estirpe, do grau de susceptibilidade do hospedeiro e do meio (FDA, 2002; McLauchlin *et al.*, 2004). No Homem e em indivíduos susceptíveis, parece que a ingestão de apenas 10^2 células bacterianas ou menos são suficientes para causarem doença (OIE, 2005; IFT, 2004; FDA, 2002). Ao invés destes, adultos saudáveis parecem ser capazes de ingerir alimentos fortemente contaminados sem que isso lhes cause doença (OIE, 2005).

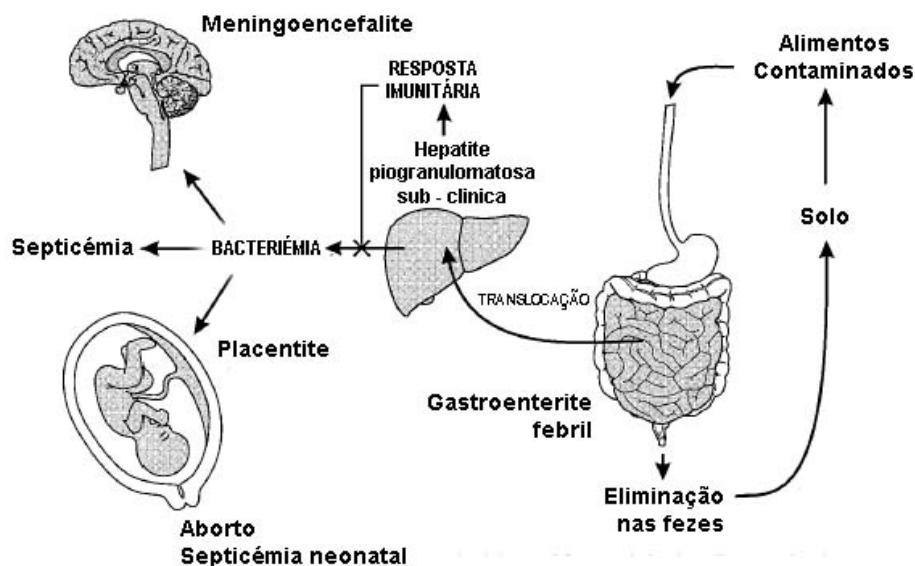


Figura 7: Possíveis evoluções da infecção por *Listeria monocytogenes* após ingestão de alimentos contaminados (adaptado de Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Além da susceptibilidade do hospedeiro, a dose infectante depende de outros factores: virulência do agente causador de infecção e tipo de alimento que pode proteger a bactéria do ambiente hostil do estômago (OIE, 2005).

A gravidade desta doença é enorme em virtude da elevada taxa de mortalidade que lhe está associada, 20-30% (WHO, 2004) e é uma das causas mais importantes de morte associada a doença de origem alimentar nos países industrializados (Barrang *et al.*, 2000; EFSA, 2007).

A infecção pode evoluir para um quadro clínico de enorme gravidade (gripe, meningite, encefalite, septicemia e ocasionalmente culminar em morte), em particular nos indivíduos pertencentes a grupos de risco, em que podemos destacar recém-nascidos, grávidas, idosos, imunodeprimidos por doença ou terapêutica, pacientes com cancro, diabetes *mellitus*, alcoólicos e doentes renais (OIE, 2005; Liu, 2007; Swaminathan & Gerner – Smidt, 2007; O'Grady, Sedano-Balbás, Maher, Smith & Barry, 2008).

Na mulher grávida a infecção pode atingir o feto, no qual pode provocar septicémia, granulomatose generalizada, doença respiratória ou meningite e que por isso pode nascer gravemente doente ou mesmo morrer antes do nascimento culminando em aborto ou nado morto (OIE, 2005; EFSA, 2007). A mãe apenas experiênciava um conjunto de sintomas não específicos semelhantes ao de uma gripe. O risco de morte do feto varia inversamente ao tempo de gestação e não há dados rigorosos relativamente a esta causa de aborto espontâneo, pelo facto de originar sintomas não específicos na grávida (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

O número de idosos, doentes crónicos e imunodeprimidos está a aumentar, pelo que a susceptibilidade da população Europeia deverá também aumentar e as consequências serão mais graves (WHO, 2004). Em Portugal, a população com idade superior a 65 anos correspondia em 2007, a 17,4% da totalidade da população (1.849.831 indivíduos) (INE, 2007), o que demonstra bem como é significativo este grupo susceptível.

Listeria monocytogenes em indivíduos saudáveis, pode ter manifestações clínicas de gastroenterite, associadas a febre (gastroenterite febril), náusea, diarreia, dor de cabeça, dor abdominal e por vezes mialgia e nos últimos dez anos a maioria dos surtos em diversos países correspondem a esta situação (OIE, 2005; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Contrariamente a outros quadros clínicos mais graves, o aparecimento de sinais ocorrem mais rapidamente, doze horas após a ingestão do alimento contaminado e é auto-limitante resolvendo-se em um a três dias (IFT, 2004; OIE, 2005). Afecta sobretudo adultos saudáveis com consumo de doses infectantes

elevadas de *Listeria monocytogenes* (IFT, 2004; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Esta fase entérica pode eventualmente ocorrer sem sintomas, ou então estes serem tão ténues que não sejam valorizados. Os indivíduos podem tornar-se portadores e estima-se, tal como referido anteriormente, que 1-10% dos indivíduos sem sintomas possam ser portadores e excretores de *Listeria monocytogenes* o que torna muito complicado relacioná-lo como agente responsável por toxinfecção alimentar ou doença de origem alimentar. Assim, deverá haver sempre isolamento a partir do próprio alimento ingerido para a confirmação (IFT, 2004).

Além desta gastroenterite, também já foi observado em indivíduos saudáveis o aparecimento de erupções cutâneas, do tipo papular ou pustular que ocorrem sobretudo em pessoas que tenham manipulado fetos ou abortos de bovinos ou realizado necrópsias em animais infectados. As erupções cutâneas podem acompanhar-se de febre, arrepios e dor generalizada, quadro clínico mais frequente na classe veterinária (OIE, 2005). Também podem aparecer conjuntivites em trabalhadores de matadouros.

7.2. Patofisiologia da listeriose humana

Após a ingestão de alimentos contaminados com *Listeria monocytogenes*, esta sobrevive ao pH ácido do estômago e vai colonizar a mucosa gástrica (FDA, 1992) causando sintomas gastro-entéricos, tal como diarreia. Depois transloca-se do intestino e vai-se replicar no baço e fígado, onde a infecção pode ser resolvida pela imunidade mediada pelos linfócitos T ou então pode chegar por via sistémica a outras partes do organismo (Chaturongakul *et al.*, 2008).

Esta bactéria invade e multiplica-se em células fagocitárias (polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos, células dendríticas) através do receptor do complemento CR3 e não fagocitárias (enterócitos e hepatócitos) (McLauchlin *et al.*, 2004). É a própria bactéria que induz a sua entrada nas células não fagocitárias do hospedeiro no caso dos mamíferos (McLauchlin *et al.*, 2004). Depois de invadir as células (Figura 8), *Listeria monocytogenes* consegue escapar aos vacúolos primários (formados aquando da entrada na primeira célula) e secundários (quando depois da replicação na primeira célula, invade a célula adjacente formando-se um vacúolo com uma dupla membrana), multiplicando-se no citosol da célula do hospedeiro (Chaturongakul *et al.*, 2008). A saída duma célula para a outra faz-se através da polimerização de actina (Chaturongakul *et al.*, 2008; Anónimo, 2007a; Orndorff *et al.*, 2006; Popowska, Markiewicz, 2006). A bactéria fica rodeada pela actina polimerizada do hospedeiro, preferencialmente num dos seus pólos resultando numa estrutura em forma de “cauda

de cometa” e permitindo a propulsão da bactéria para a célula adjacente (McLauchlin *et al.*, 2004).

Os genes envolvidos na invasão e nos movimentos intracelulares nas células de mamíferos estão localizados em operões adjacentes ou próximo do cromossoma bacteriano e a virulência é uma característica multifactorial em que temos pelo menos nove genes que se expressam na infecção, invasão, sobrevivência, mobilidade e dispersão para as células adjacentes (McLauchlin *et al.*, 2004). Cada etapa da infecção é dependente da produção de factores de virulência (Figura 8), que incluem *InlA* e *InlB* para adesão e invasão da célula, listeriolisina O (LLO), que é uma citolisina codificada pelo gene *hly* que forma poros e a fosfolipase C (PI-PLC e Pc-PLC) para escapar aos vacúolos primários e secundários e pelo gene *ActA* para os movimentos intra e extra-celulares (Orndorff *et al.*, 2006; Popowska & Markiewicz, 2006).

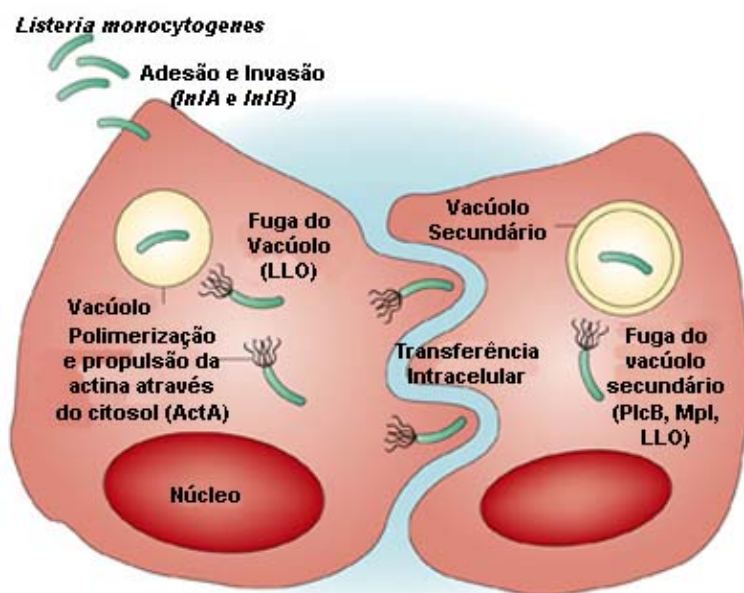


Figura 8: *Listeria monocytogenes* no interior da célula do hospedeiro (Pamer, 2004).

As estirpes virulentas de *Listeria monocytogenes* multiplicam-se no interior das células do hospedeiro, destruindo-as, adquirindo acesso a todas as áreas do organismo incluindo o sistema nervoso central, o coração, os olhos, outras localizações e ainda o feto no caso de mulheres gestantes (FDA, 1992; IFT, 2007).

A resposta imunitária do hospedeiro, envolve a imunidade inata não específica e a adquirida específica mediada pelos linfócitos T. A resposta imunitária começa

imediatamente após o despoletar da infecção e serve para conter a fase aguda, até a resposta adquirida e mediada por linfócitos T estar pronta para eliminar as bactérias que se encontram no interior das células (Orndorff *et al.*, 2006). Embora até há pouco tempo se pensasse que os anti-corpos não tinham qualquer efeito protector relativamente à infecção por *Listeria monocytogenes*, sabe-se hoje que vão neutralizar a LLO, o que torna a bactéria incapaz de escapar ao fagossoma tornando-a susceptível aos mecanismos dos vacúolos e culminando na sua morte (Orndorff *et al.*, 2006).

Existe um risco aumentado de contrair a doença por parte das grávidas, mas a razão porque tal acontece ainda não está bem determinada, tendo sido proposta como explicação a infecção por via hemática (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007; Orndorff *et al.*, 2006) ou então por via ascendente, especialmente nos casos de listeriose neonatal. O útero, tal como o sistema nervoso central possibilita o crescimento da bactéria mas parece ser certo que não existe qualquer tropismo inicial (Orndorff *et al.*, 2006).

Nos indivíduos não grávidos, as sequelas mais frequentes são as localizadas no sistema nervoso central (SNC) e o envolvimento deste traz várias complicações, uma vez que *Listeria monocytogenes* consegue replicar-se intra-celularmente. Os fármacos capazes de combater a infecção terão que atravessar a barreira hemato-encefálica e ainda algumas das células do SNC que são susceptíveis à infecção por *Listeria monocytogenes* e que não expressam os antigénios MHC classe I. Assim, a imunidade celular mediada pelos linfócitos T, muito importante neste tipo de infecção, é menos efectiva (Orndorff *et al.*, 2006).

A antibioterapia geralmente não funciona e isso deve-se ao facto descrito anteriormente, em que a bactéria consegue multiplicar-se e passar de célula para célula sem nunca abandonar o ambiente protector da célula do hospedeiro, o que não só limita a acção do antibiótico, como exige uma boa resposta imunitária do tipo celular por parte do hospedeiro (Orndorff *et al.*, 2006).

Os isolados de *Listeria monocytogenes* são naturalmente susceptíveis às penicilinas, aminoglicosídeos, trimetoprim, tetraciclinas, macrólidos e vancomicina. Possuem reduzida susceptibilidade ou mesmo resistência ao sulfametoxazol, cefalosporinas e quinolonas mais antigas, mas são geralmente sensíveis à fluorquinolona. A resistência antimicrobiana é rara nos isolados clínicos de listeriose humana mas algo significativa nos isolados de animais, o que pode significar que também vai emergir em humanos (Orndorff *et al.*, 2006).

O tratamento da listeriose consiste na administração de doses intravenosas elevadas de penicilina ou ampicilina e simultaneamente ou não aminoglicosídeos. Nos casos de alergia à penicilina, as drogas de eleição são vancomicina/teicoplanina ou trimetoprim/sulfametoxazol (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Todas as estirpes de *L. monocytogenes* são intrinsecamente resistentes às cefalosporinas (EFSA, 2008).

Não há vacina contra *Listeria* spp. e por isso o único meio de prevenir a Listeriose é reduzindo a exposição de pessoas susceptíveis a alimentos contaminados. Por esta razão a contaminação dos alimentos deve ser controlada devendo ser informada a população de risco sobre as regras básicas de higiene (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

8. Epidemiologia

A investigação epidemiológica demonstrou que são poucos os alimentos que não transmitem *Listeria monocytogenes* causadora de doença, a maioria dos casos são esporádicos ou surtos e estão associados a alimentos processados (Roche & Gracieux, 2009).

A primeira vez que *Listeria monocytogenes* foi associada a doença no Homem, foi no Canadá em 1981, quando surgiu o primeiro surto de doença de origem alimentar que atingiu 60 pessoas e causou a morte a 20 devido ao consumo de uma salada de repolho cru. Um outro surto no ano de 1983, em Massachusetts teve origem na ingestão de leite de vaca pasteurizado, questionando-se a eficácia da pasteurização na eliminação deste agente. A contaminação ter-se-ia devido a uma elevada concentração de *Listeria monocytogenes* no leite cru, protegida no interior das células. Estudos posteriores demonstraram que a pasteurização é eficaz a eliminar esta bactéria (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

Antes de ocorrerem grandes surtos, *Listeria monocytogenes* era tida apenas como um importante agente patogénico em veterinária, e interessantemente também associado à ingestão de alimentos contaminados para animais (Barbalho *et al.*, 2005). Após as ocorrências de infecções descritas, foi então associada à ingestão de diferentes géneros alimentícios contaminados, onde se incluem o queijo, a carne, o leite, os vegetais e o peixe (O' Grady, Sedano-Balbás, Maher, Smith & Barry, 2008).

Um grande surto com queijo *Mexican Style*, em 1985, estabeleceu definitivamente *Listeria monocytogenes* como agente de doença de origem alimentar. Outros surtos associados a queijo evidenciaram o perigo da utilização de leite cru na produção de queijo. Os alimentos pré-cozinhados ou prontos a consumir também constituem

motivo de preocupação, pois têm ocorrido surtos de listeriose relacionados com este grupo de alimentos (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

No Reino-Unido foram referenciados dois casos de listeriose associados a frango pré-cozinhado refrigerado e a peru adquiridos em supermercado, envolvendo uma mulher grávida e um indivíduo com cancro, respectivamente, passando a carne de aves a ser considerada uma fonte de listeriose (Barbalho *et al.*, 2005).

Listeria monocytogenes tem sido isolada de carcaças de frango e seus derivados, em países industrializados tais como os EUA e países da Europa (Tabela 6). Foi também isolada em “sandwich” de frango e em alimentos cozinhados prontos a consumir à base de frango (Barbalho *et al.*, 2005).

País		Descrição	Contagem <i>Listeria monocytogenes</i>		Detecção <i>Listeria monocytogenes</i>		
			Unidades Testadas (presença)	N em 25g	Unidades Testadas (contagem)	N Detectada com ≤ 100 ufc/g	N Detectada com > 100 ufc/g
Estónia	Aves	Carne de frango, cozinhado no comércio retalhista	28	0	---		
França	Aves	Carne de frango, cozinhado	---	---	33	30,3	0
Irlanda	Aves	Carne de frango, cozinhado no processamento	65	0	---	---	---
	Aves	Carne de frango, cozinhado no comércio retalhista	104	36,5	104	0	1
	Aves	Carne de frango, cozinhado no comércio retalhista	---		545	0	0
Itália	Aves	Carne de frango, cozinhado	385	0			
Répubblica Checa	Bando	Carne de frango, cozinhado		83	0	---	---
Polónia	Bando	Carne de frango, cozinhado		710	0		
Eslováquia	Bando	Carne de frango, cozinhado		153	---	---	---

Tabela 6: *Listeria monocytogenes* em carcaças de frango e seus derivados, 2006 (Adaptado de EFSA, 2007).

Em 2002, foi levado a cabo um estudo para avaliar a necessidade e a viabilidade de uma rede europeia que centralizasse toda a informação sobre as infecções humanas provocadas por *Listeria monocytogenes*. Em todos os países questionados (Áustria, Alemanha, Bélgica, Dinamarca, Escócia, Espanha, Finlândia, França, Grécia, Holanda, Irlanda, Islândia, Itália, Noruega, Portugal, Reino Unido, Suécia, Suíça), excepto Portugal, existiam sistemas de vigilância da listeriose e tinham um laboratório

nacional de referência (LNR) para *Listeria monocytogenes*. Em todos os países, a definição de caso de listeriose estava baseada no isolamento de *Listeria monocytogenes*. Catorze LNR utilizavam pelo menos um método de tipificação das estirpes humanas. Treze países caracterizavam os isolados das estirpes humanas por electroforese em campo pulsátil (PFGE) seguindo um protocolo harmonizado ou tinham intenção de o fazer. Para os países participantes, a existência de uma rede de vigilância europeia da listeriose seria um verdadeiro valor acrescentado, especialmente para a detecção e a investigação de surtos. Também foi confirmada a viabilidade de uma rede de vigilância baseada nos programas nacionais existentes (Valk *et al.*, 2005).

Em 2005 foram referidos na Comunidade Europeia 1427 casos de listeriose, e em 2006 os estados membros reportaram 1583 casos, todos confirmados laboratorialmente, o que corresponde a uma média de 0,3 casos por cada 100 000 habitantes, representando um acréscimo de 8,6% relativamente aos anos de 2005 e 2004 (EFSA, 2007). Refira-se ainda que estes valores são os mais elevados dos últimos oito anos na Europa (Denny & McLauchlin, 2008). A incidência de listeriose em 2006 (Figura 9), relativamente aos cinco anos anteriores na União Europeia, teve um aumento significativo, para o qual muito contribuíram os aumentos da doença

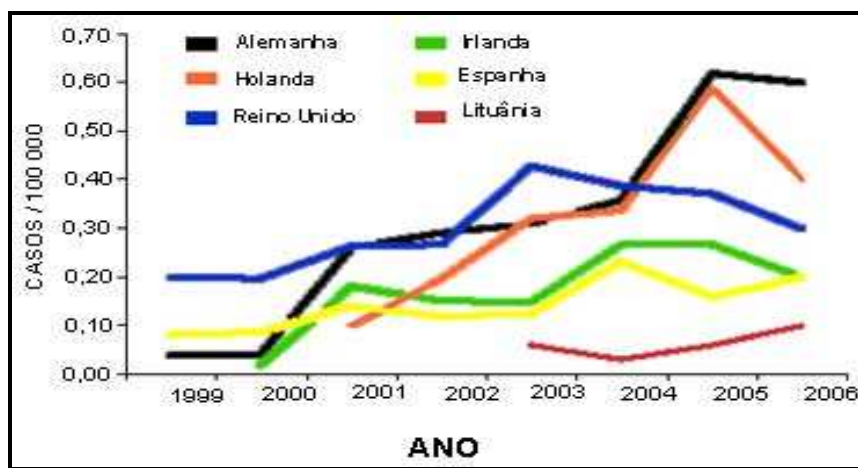


Figura 9: Incidência de listeriose humana nos países com aumentos estatisticamente significativos, período entre 1999 a 2006 (adaptado de Denny & McLauchlin, 2008).

registados em França e República Checa (EFSA, 2007). Neste ultimo país, ocorreu um surto, com setenta e oito pessoas afectadas e treze mortos, associados ao

consumo de queijo de pasta mole, tendo sido o único surto reportado nesse ano (Denny & McLauchlin, 2008).

O caso da França é particular, pois a listeriose é de declaração obrigatória o que faz aumentar os casos reportados (EFSA, 2007). A França, Alemanha e Reino Unido apresentaram 64% do total dos casos de listeriose humana declarados em 2005 e 2006 na União Europeia. A Dinamarca e o Luxemburgo registaram as maiores incidências de listeriose, com valores iguais ou superiores a 0,9 casos por 100 000 indivíduos no ano de 2006 (Denny & McLauchlin, 2008).

A listeriose em Portugal não é uma doença de declaração obrigatória mas há estudos que indicam a sua existência (Mena *et al.*, 2004; Chambel *et al.*, 2007). Segundo os resultados apresentados pela própria EFSA, a situação em Portugal não está oficialmente documentada e não há valores actuais quanto à expressividade da listeriose humana.

A listeriose humana ocorre durante todo o ano na Europa, mas em 2006 existiu um pico no final do ano (Denny & McLauchlin, 2008). Quanto à distribuição etária (Figura 10), a maioria das infecções ocorrem no grupo etário acima dos 65 anos (55,6%) e do sexo masculino (54%), seguido do grupo etário imediatamente anterior compreendido entre os 45 e os 65 anos (24,3%). As crianças com idade inferior a 4 anos têm uma incidência de 0,4 casos por cada 100 000 habitantes (7%) (Denny & McLauchlin, 2008; AVEC, 2008; EFSA, 2007).

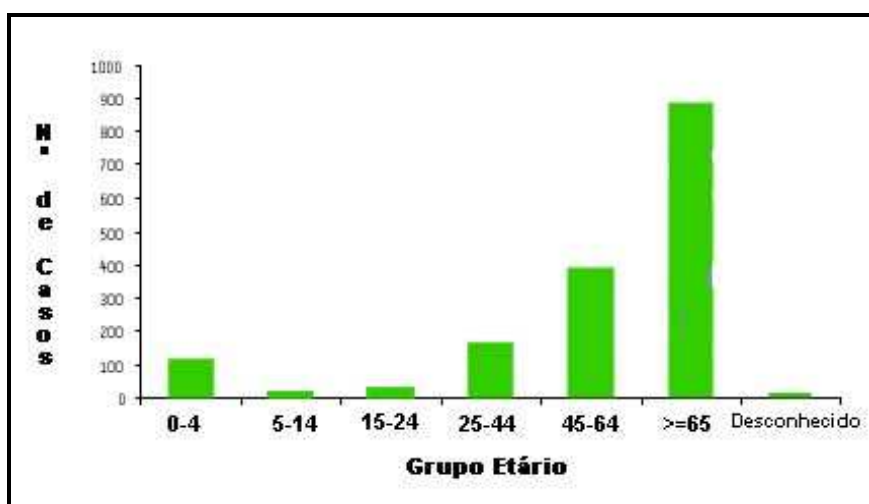


Figura 10: Incidência de listeriose humana por grupo etário (adaptado de Denny & McLauchlin, 2008).

Aproximadamente 33% dos casos documentados de listeriose acontece em mulheres grávidas e estas representam 60% da totalidade dos casos entre os 10 e os 40 anos (Orndorff *et al.*, 2006).

No total dos casos conhecidos de toxinfecções causadas por *Listeria monocytogenes*, 59,7% tiveram origem em contaminação do ambiente doméstico e 36,6% por causas desconhecidas (EFSA, 2007).

Nos Estados Unidos da América, estima-se que anualmente ocorram 76 milhões de toxinfecções alimentares, e sabendo-se que os dados (tal como no caso Europeu) se reportam apenas aos casos confirmados este valor está sem dúvida sub-estimado. Destes, 30% tem causa bacteriana (Tabela 7), 3% parasitária e 67% têm origem viral (IFP, 2004).

Bactéria	Nº de doentes	Nº de mortes
<i>Bacillus cereus</i>	27 360	0
<i>Campylobacter spp</i>	1 963 141	99
<i>Clostridium botulinum</i>	58	4
<i>Clostridium perfringens</i>	248 520	7
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1:100 000 Crianças	
<i>Listeria monocytogenes</i>	2 493	499
<i>Salmonella spp.</i>	1 342 532	556
<i>Shigella spp.</i>	89 648	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	185 060	2
<i>Vibrio spp</i>	145	18
<i>Yersinia enterocolitica</i>	86 731	2

Tabela 7: Infecções de origem alimentar nos EUA (Adaptado de IFP, 2004)

O estudo epidemiológico da listeriose é particularmente complexo, porque o tempo de incubação pode ser longo e muito variável, cinco a setenta dias, (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Aliam-se outros factores tais como o facto dos géneros alimentícios estarem disponíveis para consumo apenas num período de tempo relativamente curto após a sua colocação no mercado. Por outro lado, a contaminação do ambiente fabril pode manter-se por um período de tempo longo, e por isso podem produzir-se alimentos contaminados mesmo com longos intervalos de tempo entre produções. Assim, as ocorrências de listeriose podem ser muito dispersas no tempo e no espaço o que impossibilita muitas vezes relacionar a doença

com o alimento, embora se assuma que a maioria dos casos de listeriose se devam a alimentos (McLauchlin *et al.*, 2004).

9. Controlo de *Listeria monocytogenes*

Não podemos esperar conseguir um controlo absoluto da presença de *Listeria monocytogenes* em matadouros, salas de desmancha e locais de transformação de carcaças, pois é uma bactéria ubiqüitária e que por isso facilmente poderá re-infectar estes locais, mas podemos tomar determinadas medidas pro-activas e correctivas que minimizem este risco.

9.1. Medidas pro-activas

9.1.1. Redução dos agentes patogénicos para o Homem nos bandos

A existência de agentes patogénicos nos bandos conduz a contaminação directa e indirecta de alimentos. Consequentemente, a pele e as penas contaminadas por fezes são as fontes principais de contaminação das carcaças.

Os agentes entéricos patogénicos, tais como *Salmonella* spp. e *C. jejuni*, existem em várias espécies animais e por isso uma espécie animal pode servir como reservatório para uma outra. Assim as explorações devem dedicar-se apenas a uma única espécie animal (Doyle & Erickson, 2006).

As variações genéticas podem alterar o modo como as aves resistem à colonização bacteriana. Foram observadas nas galinhas diferentes respostas à colonização por *S. Enteritidis* ou à vacinação e tem sido sugerida a selecção de linhagens genéticas que possuam resistência genética natural às infecções entéricas, objectivo esse dificultado pela falha na identificação dos mecanismos genéticos independentes que o controlam (Doyle & Erickson, 2006).

Devem ser adoptadas práticas de saneamento que possam impedir a contaminação da exploração, do ambiente e do transporte (Doyle & Erickson, 2006):

- Limpeza dos aviários e equipamento entre a saída de um bando e entrada de outro, em sistema “*all-in/all-out*” que inclui a desinfecção do sistema de fornecimento de água;
- Remoção de todo o material fecal e camas, antes da entrada de um novo bando;
- Minimização da exposição do equipamento, da alimentação, e dos bandos aos animais selvagens (pássaros, roedores, etc.);

- Restrição e minimização do tráfego na exploração, nos alojamentos e entre bandos;
- Existência de locais de higienização de veículos e do pessoal;
- Limpeza e desinfecção das caixas e veículos de transporte após cada utilização.

9.1.2. Boas práticas de abate e HACCP (“Hazard Analysis Critical Control Point”)

As etapas mais susceptíveis de originarem contaminação são a recepção das aves vivas, o escaldão, a depena, a lavagem das aves com água sob pressão devido à formação de aerossóis, a evisceração e os túneis de frio.

Durante o transporte as aves encontram-se geralmente em stress e os portadores saudáveis podem eliminar muitas bactérias patogénicas juntamente com as fezes. Por ingestão das fezes, as aves não portadoras tornam-se susceptíveis à infecção.

A infecção pode ser reduzida se o tempo de espera até à entrada na linha de abate for pequeno, e mantendo a zona de recepção das aves limpa e isenta de penas e fezes de bandos anteriores. A limpeza regular das instalações e do equipamento associada a uma drenagem adequada ajudam a eliminar o número de agentes patogénicos que entram na linha de abate. As jaulas e os camiões contaminados introduzem microrganismos patogénicos no interior do matadouro. Quando as jaulas de transporte dos animais são limpas, deve ser eliminada a matéria orgânica primeiro e só depois aplicado o desinfectante. De modo a minimizar a contaminação transversal entre a área de recepção de aves vivas e as áreas menos contaminadas do matadouro, é benéfico que a dependura seja efectuada em zona escurecida e que haja limitação da circulação entre estas áreas. A zona de recepção de aves vivas deverá ser limpa regularmente (Herenda & Franco, 1996).

De forma muito simplificada, podemos minimizar as contaminações cruzadas se durante o abate eliminarmos as aves doentes, se o tratamento das aves com penas e patas ocorrer em zona separada da de evisceração e se for usada água potável em abundância para lavagem tanto dos equipamentos e utensílios como das mãos. A limpeza dos trabalhadores e das instalações deve ser regular e rigorosa (Hubbert, Hagstad, Spangler, Hinton & Hughes, 1996).

As boas práticas, tal como na agricultura devem existir para minimizar os perigos microbiológicos associados aos alimentos desde a sua produção e através da distribuição dos produtos finais (USDA, 1999).

Algumas das boas práticas que devem ser aplicadas para de uma forma geral minimizar os riscos de contaminação por *Listeria monocytogenes* (USDA, 1999):

- a. Seleccionar matérias-primas e ingredientes e se necessário utilizar critérios microbiológicos para aceitar ou rejeitar essas matérias-primas e ingredientes;
- b. Evitar a contaminação e/ou a introdução de *L. monocytogenes* nos locais de processamento de alimentos; combater a multiplicação e a dispersão de *Listeria monocytogenes* nos locais de processamento de alimentos, nomeadamente programas de gestão e monitorização do ambiente;
- c. Inactivar *Listeria monocytogenes* através de pasteurização, esterilização, confecção a pressão elevada, entre outros;
- d. Remover *Listeria monocytogenes* dos produtos, através da lavagem por exemplo;
- e. Prevenir a recontaminação de alimentos já processados e embalados, por exemplo separando os alimentos crus dos já cozinhados; reduzir os teores microbianos em alimentos cozinhados e embalados; prevenir o aumento dos níveis de *Listeria monocytogenes* entre a embalagem e o consumo;
- f. Estabelecer planos e incentivos que contribuam para minorar os riscos através do desenvolvimento de sistemas de segurança alimentar como por exemplo o HACCP ("Hazard Analysis Critical Control Point").

O sistema HACCP é uma aproximação científica ao controlo do processo. É projectado para impedir a introdução de perigos, assegurando que os controlos dos pontos críticos são aplicados em qualquer momento do sistema de produção alimentar, onde as situações perigosas ou críticas poderiam ocorrer. Os perigos incluem a contaminação biológica, química, ou física de alimentos. Embora o HACCP dê algumas garantias de que as aves abatidas e desmanchadas em locais onde ele está implementado são seguras, não há maneira de eliminar completamente todos os perigos. A implementação do HACCP é mais eficaz quando são previamente cumpridos os pré-requisitos e se fazem auditorias sistemáticas para avaliar a eficácia (USDA, 1999; Northcutt & Russel, 2003).

9.2. Tratamentos tecnológicos aplicados a carcaças e carne de frango

9.2.1. Irradiação

A irradiação de carcaças de frango, prática utilizada em diversos países como o Brasil e EUA, mas não permitida na União Europeia, reduz a contaminação das carcaças por *Listeria monocytogenes*, contudo algumas células podem sobreviver e

crescer durante o período de armazenamento em refrigeração (Zhu, Mendonça, Ismail & Ahn, 2008).

Como efeitos colaterais temos a alteração da flora microbiana, consequência das diferentes sensibilidades que os vários grupos de bactérias possuem à irradiação, aumento da oxidação e alterações da cor e sabor da carne.

9.2.2. Tratamentos anti-microbianos (AMT) das carcaças

Na UE, a água do escaldão e da lavagem tem que ser água potável, no entanto existem outros países como EUA e Brasil, em que é permitida a adição de hipocloritos à água de lavagem dos frangos, que ajudam a eliminar *Listeria monocytogenes* e outros agentes patogénicos das carcaças. O tratamento anti-microbiano (AMT) utilizado com maior frequência na descontaminação de carcaças de frango é o hipoclorito de sódio, por ser barato, seguro e de fácil utilização. No entanto, as suas propriedades anti-microbianas podem ser diminuídas por variação de pH, concentração (de hipoclorito), composição da água e existência de matéria orgânica. Além disso, podem originar maus odores e compostos carcinogénicos (tricloraminas) resultantes da reacção do cloro com a matéria orgânica (Barbalho *et al*, 2005; Northcutt, Smith, Ingram, Hinton & Musgrove, 2007).

Segundo a *Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU Countries* (AVEC), as medidas rigorosas de higiene aplicadas actualmente nas explorações da UE e os programas de controlo de zoonoses são suficientes para o controlo microbiológico das carcaças. Foram publicados resultados por parte da *Scientific Committee on Health and Environmental Risks* (SCHER), *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* (SCENIHR) e *Panel on Biological Hazards* (BIOHAZ, EFSA) em Abril de 2008 que levantam sérias dúvidas sobre a eficiência da aplicação de AMT. Contudo, a Comissão Europeia poderá propor a utilização de AMT durante um período de teste de dois anos, muito pelo facto de os EUA exercerem pressão quanto ao actual impedimento pela UE de importação da sua carne de frango tratada com soluções de cloro (AVEC, 2008).

10. Causas de sucesso da *Listeria monocytogenes*

Podemos questionar sobre a razão de *Listeria monocytogenes* se ter tornado uma bactéria emergente nos países desenvolvidos e industrializados. O que acontece aos países desenvolvidos como a Alemanha, o Reino Unido, a Dinamarca, a Espanha, a França ou a Finlândia, onde existe já a implementação dos planos de HACCP, práticas meticulosas de higiene, tecnologia avançada e monitorização rigorosa, mas

cuja listeriose tem vindo a aumentar nos últimos anos? Podemos achar que estamos apenas perante melhores e maiores estratégias de comunicação de risco e de casos de doença, quando comparado com países como Portugal ou do Leste Europeu cujos dados referentes à listeriose são escassos? Dever-se-à a um consumo crescente de alimentos processados com maior risco de contaminação ou será a própria bactéria que está a mudar? (Hagens, 2008).

Em suma, as causas deste sucesso podem ser (WHO, 2004. Anónimo, 2007 d):

- I. Técnicas laboratoriais de isolamento melhores, mais sensíveis e mais específicas;
- II. Características da própria bactéria que ao invés de outros agentes causadores de toxinfecções alimentares bem mais conhecidos e frequentes, não causam sintomas típicos de gastroenterite, apresentando um quadro de sintomas mais grave, caracterizado por meningite ou septicémia;
- III. Afecta com maior frequência os indivíduos mais susceptíveis o que pode explicar a taxa de mortalidade elevadíssima que lhe está associada, e é este potencial efeito nefasto em consumidores vulneráveis que torna *L. monocytogenes* tão perigosa;
- IV. Período de incubação muito variável, o qual pode chegar aos dois meses ou mais e que torna muito difícil associá-la à infecção, em particular nos casos ou em grupos pequenos;
- V. Bactéria diferente dentro do grupo de agentes patogénicos de origem alimentar, por crescer a temperaturas muito baixas, que podem atingir os 0°C (psicotróficas), o que lhe confere capacidade para se multiplicar em ambientes refrigerados;
- VI. É mais resistente ao calor, desidratação e irradiação que as suas congéneres, e também mais tolerante a variações ambientais;
- VII. Aumento acentuado da produção de produtos refrigerados prontos a serem consumidos com prazos de validade longos, que podem criar nichos ecológicos para o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* e que não foram considerados aquando da criação dos sistemas massificados de produção actuais;

VIII. Aumento muito significativo da produção e do consumo de carne de frango (Anuário pecuário, 2008);

IX. Variabilidade de virulência de *L. monocytogenes*, que faz variar a sobrevivência e a virulência destes subtipos (López, Suárez, Chico-Calero, Navas, Martinez-Suarez, 2006).

10.1. Modulação pelo Stress: Termotolerância de *Listeria monocytogenes*

Um dos factores que explica a ocorrência de infecções alimentares por *Listeria monocytogenes* é o facto de tão bem se adaptar às temperaturas de refrigeração.

Actualmente, é referido que *Listeria monocytogenes* tem capacidade de adquirir termoresistência, o que é grave tendo em conta que o processamento térmico dos alimentos é o método mais frequentemente aplicado para destruição dos agentes patogénicos (Lin & Chou, 2004; Sergelidis & Abraham, 2009).

Embora estejamos na presença de uma bactéria não produtora de esporos, ela tem capacidade para se tornar tolerante a temperaturas elevadas (Sergelidis & Abraham, 2009).

Os microrganismos desenvolvem termotolerância quando são expostos a diferentes tipos de stress ambiental tal como choque térmico, choque osmótico, sub-nutrição, contacto com ácidos ou bases, exposição ao etanol e ao peróxido de hidrogénio.

As condições a que sujeitamos as bactérias durante o processamento dos alimentos mimetizam condições de stress ambiental o que fazem com que *Listeria monocytogenes* monte uma resposta adaptativa durante a exposição a intervenções sub-letais do processamento (Skandamis, Yoon, Stopforth, Kendall & Sofos, 2007).

Muitas bactérias desenvolvem tolerância a temperaturas elevadas após terem sido expostas previamente a valores de temperatura acima da sua temperatura óptima de crescimento, por um período curto de tempo. O choque térmico é de extrema importância em saúde pública, em especial quando temos bactérias psicrófilas como é o caso de *Listeria monocytogenes*, pois as células que sobrevivem podem depois crescer durante o armazenamento em refrigeração e mais rapidamente que as saprófitas. Não há ainda dados quanto às temperaturas que induzem a termotolerância bacteriana (Sergelidis & Abraham, 2009).

A carne e os produtos à base de carne quando são aquecidos lentamente até à temperatura desejada no seu centro térmico, podem ter microrganismos tolerantes ao aumento da temperatura por exposição prévia a choque térmico. Quanto mais lento o

aquecimento, maior a tolerância à temperatura. Nos alimentos sólidos há penetração do calor por condução de forma lenta, criando um gradiente térmico que pode funcionar como choque térmico provocando um aumento da resistência de *Listeria monocytogenes* à temperatura. (Sergelidis & Abraham, 2009).

Este fenómeno deve-se a uma resposta fisiológica por parte de *Listeria monocytogenes*, para proteger as proteínas celulares, traduzindo-se em produção de varias proteínas conhecidas por proteínas de choque térmico (PCT) (Sergelidis & Abraham, 2009). Estas têm como função proteger a célula das alterações físicas induzidas pelo calor e também induzir a proteólise ou novo enrolamento de proteínas anormais que tenham sido desnaturadas pelo calor. Estas PCT são chaperoninas, um tipo de proteínas citoplasmáticas, com várias funções de protecção da célula, tais como assistência nas interacções proteína-proteína (ex: enrolamento, conformação, estabilização das proteínas parcialmente não enroladas, transposição das proteínas ao longo da membrana celular, entre outras) que existem nos procariotas e nos eucariotas e que mesmo sem factores de stress podem ser encontradas nas células ainda que em concentrações reduzidas.

O aumento da expressão das chaperoninas é regulado ao nível da sua transcrição, sendo induzido em grande parte por factores de choque térmico. O aumento da síntese destas proteínas pode dever-se também à exposição a outros factores de stress tais como etanol, arsénio, luz ultra-violeta, privação de água, privação de alimento, etc., mostrando que mais do que proteínas de choque térmico, estas são parte de uma resposta a um factor modulador de stress da célula. Parece não haver universalidade quanto a estas estruturas proteicas, sendo no entanto comuns a um ou dois tipos de factores de stress (Sergelidis & Abraham, 2009).

Após ser desenvolvida a termotolerância como resultado da adaptação ao calor, *L. monocytogenes* desenvolve em simultâneo tolerância a outros factores de stress (Sergelidis & Abraham, 2009). Em geral temos que, para um choque térmico de 45°C durante uma hora, aumenta a tolerância ao NaCl (25%), ao etanol (18%) e ao cristal de violeta (0,01%), (Lin & Chou, 2004). A termotolerância parece estar dependente da combinação de vários factores de stress, mas não da sequência com que eles ocorrem. Uma combinação de pH baixo e temperatura insuficientemente alta pode ser suficiente para que a segurança do alimento seja posta em causa (Skandamis *et al.*, 2007).

O grau que esta resistência pode assumir depende da espécie bacteriana, da estirpe (Lin & Chou, 2004; Skandamis *et al.*, 2007), da fase de crescimento (Lin & Chou, 2004), da composição do meio do choque térmico e da sua temperatura. A

temperatura indutora de stress térmico a que as células são sujeitas deverá ser igual à que provoca morte bacteriana. Assim, pode acontecer morte bacteriana em simultâneo com a aquisição de termotolerância por parte de outras bactérias ainda vivas (Sergelidis & Abraham, 2009).

Esta adaptação pode ter consequências gravíssimas para a indústria alimentar, comprometendo a conservação e a segurança dos alimentos, sem esquecer os múltiplos factores de stress a que os alimentos estão sujeitos durante o processamento, distribuição e armazenamento, fases essas que deverão ser revistas e estudadas de modo a obterem-se novos modelos preditivos de segurança alimentar (Sergelidis & Abraham, 2009).

Os mecanismos de adaptação ao stress causado pelas condições ambientais ou pela transformação e conservação dos alimentos na indústria (temperaturas extremas, falta de nutrientes e acidez), podem causar alterações na célula bacteriana, que se por um lado dificultam a detecção de células de *L. monocytogenes* danificadas de forma subletal, por outro lado, podem afectar a virulência. *L. monocytogenes* encontra condições similares (pH ácido, temperatura elevada, stress oxidativo) durante o seu ciclo intestinal e também intracelular (no fagossoma). É possível que algumas tecnologias normalmente usadas na indústria alimentar, como a refrigeração, desidratação, congelação, descongelação, tratamentos com sal, pH ácido, exposição a desinfectantes e outras substâncias antimicrobianas sejam, entre outros factores, capazes de induzir alterações na virulência bacteriana e seleccionar subpopulações de bactérias mais resistentes ao stress e mais virulentas, e podem atingir a população humana, por isso é necessário estudar a sua rastreabilidade e conhecer o risco real que representam. A análise da virulência de estirpes específicas de *L. monocytogenes* isoladas da indústria alimentar poderia contribuir para resolver o dilema que envolve a elevada contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes* ao longo da cadeia de produção de determinados alimentos, e que não é acompanhada de um correspondente elevado número de casos de listeriose (López *et al.*, 2006).

11. Detecção de *Listeria monocytogenes*

Sabendo que as espécies de *Listeria* são encontradas essencialmente como contaminantes de alimentos, isto pode indicar um potencial risco de contaminação por *L. monocytogenes* e a sua presença requer actuação imediata por parte do operador económico. São por isso fundamentais às metodologias rápidas e fidedignas que permitam identificar a presença de *Listeria monocytogenes*, diferenciando-a das restantes espécies do género, aspecto muito relevante para a indústria alimentar.

11.1. Método clássico

Actualmente a presença de *Listeria* spp. e de *Listeria monocytogenes*, é detectada pelo método de referência ISO 11290-1, modificado em Fevereiro de 2005 (Roche & Gracieux, 2009). Neste método de referência, depois de utilizados meios líquidos selectivos de enriquecimento, as amostras ou as diluições apropriadas são semeadas em meio selectivo, Agar Listeria de acordo com Ottaviani e Agosti (ALOA). Este meio, baseia-se simultaneamente na detecção da actividade da fosfolipase C fosfatidilinositol-específica (PIPLC) e na actividade da β -glucosidase (Leclercq, 2004). A PIPLC é uma enzima associada à virulência que está presente nas espécies de *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii*, cuja actividade é detectada no meio de ALOA através da degradação do L- α -fosfatidilinositol (suplemento enriquecedor presente no Agar), o que leva à formação de um precipitado em volta da colónia, originando um halo opaco. A actividade da β -glucosidase torna-se visível num substrato cromogénico, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glicosido, o qual é hidrolisado e confere às colónias cor azul em todas as espécies de *Listeria* spp. Além destes, o ALOA tem também um suplemento selectivo, constituído por diferentes antibióticos e agentes anti-microbianos (ácido nalidíxico, ceftazidime, polimixina B, cicloheximida, ou anfotericina B) (Leclercq, 2004).

Este método, além de moroso, (Rodriguez-Lázaro *et al.*, 2004; Liu, 2008), cinco dias para casos negativos e mais de dez para os positivos (O'Grady *et al.*, 2008) baseia-se numa série de provas fundamentadas nos caracteres fenotípicos, bioquímicos e serológicos (Liu, 2008). Estes, além de demorados podem dar resultados não fidedignos uma vez que caracterizam proteínas de *L. monocytogenes* cuja estrutura e função pode ser alterada por factores externos, por exemplo a existência de colónias atípicas de bactérias mutantes que não produzam PIPLC (Leclercq, 2004).

Nem sempre se conseguem obter colónias típicas e determinar a concentração inicial com os métodos de referência, relativamente a alguma estirpe de *Listeria monocytogenes*. Nos casos em que após 24 ou 48 horas de incubação conforme descrito na norma ISO 11290 – 1 e 2, não se observarem colónias típicas, devemos prolongar o prazo em pelo menos mais 96 horas uma vez que os tempos recomendados podem ser claramente insuficientes (Leclercq, 2004). Esta situação torna este método ainda mais moroso além de não permitir a distinção entre espécies dificultando o isolamento e a contagem de *Listeria monocytogenes*. Por outro lado se a amostra tiver para além de *Listeria monocytogenes* outras bactérias em proporção

elevada, tal como *L. innocua*, estas podem competir com a espécie-alvo pelo meio de enriquecimento (Amagliani, Giammarini, Omiccioli, Brandi & Magnani, 2007).

Roche & Gracieux (2009), determinaram que algumas estirpes menos virulentas de *Listeria monocytogenes* são mais susceptíveis a alguns dos agentes selectivos presentes nos diferentes meios selectivos como o caso da ceftazidime do ALOA que poderão não ser detectadas pela metodologia ISO. Este facto tem particular relevância nos alimentos que a legislação prevê ausência total deste microrganismo.

11.2. PCR

11.2.1. Generalidades

Como consequência da morosidade dos métodos convencionais de identificação de *Listeria monocytogenes*, foram feitos ao longo do tempo esforços para encontrar métodos alternativos mais eficientes e rápidos. Alguns dos métodos desenvolvidos baseiam-se na detecção de DNA ou RNA em vez de proteínas, uma vez que os ácidos nucleicos, em particular o DNA, têm menor probabilidade de serem afectados por variações externas (Liu, 2008). Além disso, baseando-se na amplificação do sinal biológico (DNA ou RNA), estes métodos são mais rápidos e sensíveis e permitem reduzir o tempo de análise até a obtenção de resultados. Os custos destes métodos são também reduzidos, exceptuando-se o investimento inicial, o que é óptimo para a indústria (O'Grady *et al.*, 2008).

Os métodos moleculares para detecção e identificação de *Listeria monocytogenes* remontam aos anos 90 e nos últimos 10 anos têm nos últimos tempos sofrido enorme evolução (Rantsiou, Alessandria, Urso, Dolci & Cocolin, 2008). Um dos métodos moleculares é a reacção em cadeia da polimerase (Figura 11) vulgarmente conhecido por PCR (Polimerase Chain Reaction) que permite uma amplificação controlada *in vitro*, por enzimas, de um fragmento de DNA de interesse, de forma extremamente rápida. Com o PCR, quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas, permitindo a detecção rápida e fiável de diferentes marcadores genéticos (Brown, 2006).

Permite amplificar qualquer região da cadeia de DNA, desde que conhecidas as sequências das extremidades dessa mesma região (Figura 12), para que possamos adicionar dois “primers”, que são pequenas sequências de DNA iniciadoras que vão hibridar com a molécula de DNA que queremos amplificar, um em cada extremidade da hélice (Brown, 2006).

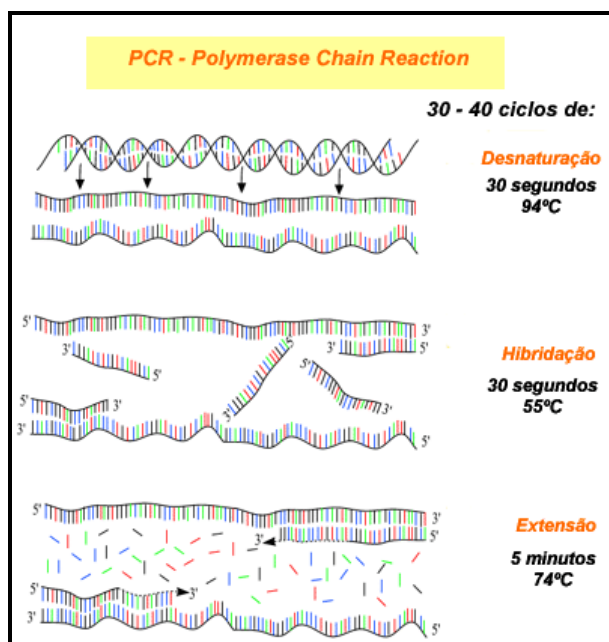


Figura 11: Exemplo da reacção da polimerase em cadeia – PCR (adaptado de Vierstraete, 1999).

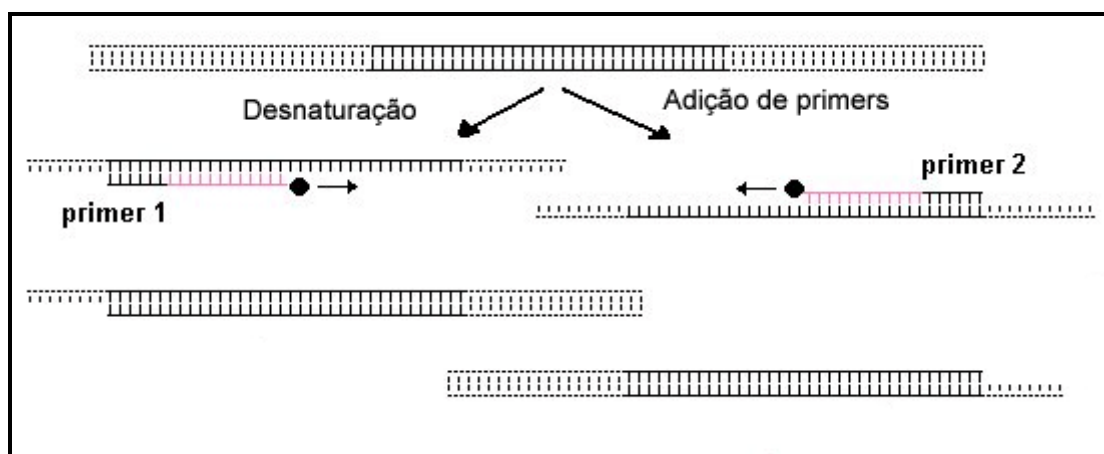


Figura 12: Etapas iniciais de um PCR: desnaturação da dupla cadeia de DNA e hibridação dos “primers” (adaptado de Vierstraete, 1999).

A amplificação é efectuada por uma enzima denominada polimerase. Esta polimerase, tal como todas as enzimas funcionam melhor à temperatura corporal. Abaixo da sua temperatura óptima a actividade enzimática é reduzida e acima da temperatura óptima a polimerase é destruída. Contudo, para que as cadeias de DNA sejam separadas e ocorra a ligação dos “primers”, é necessária uma temperatura de 95°C. A esta temperatura as polimerases da maioria dos organismos é destruída. A solução encontrada foi a utilização de uma DNA-polimerase sintetizada pela bactéria termófila *Thermus aquaticus*, denominada de Taq polimerase que é termoestável,

resistindo à desnaturação pelo tratamento térmico da metodologia PCR (Brown, 2006).

Para que a amplificação do material genético comece, a enzima Taq-polimerase é adicionada ao DNA com os “primers” e nucleótidos. De modo a dar início à síntese de novas cadeias complementares, a mistura é então aquecida (a 95°C) para que as cadeias de DNA se separem e arrefecida em seguida para que os “primers” possam hibridar nas suas posições respectivas, seguindo-se um aquecimento para extensão das cadeias de DNA, cópias do DNA molde (síntese). O ciclo desnaturação-hibridação-síntese é geralmente repetido 25 a 30 vezes resultando numa síntese de várias centenas de milhar de cópias de fragmentos do DNA amplificado. No final do PCR, geralmente a mistura resultante da reacção é analisada através de electroforese em gel de agarose. O DNA produzido durante a reacção será visível como uma banda discreta revelada pelo brometo de etídeo (Brown, 2006).

11.2.2. Primers

A selecção dos “primers” é essencial para a execução da metodologia PCR, em que apenas se tem amplificação da região da cadeia de DNA desejada se os “primers” escolhidos forem complementares das extremidades 3’ e 5’ dessa mesma zona da cadeia. Deste modo uma selecção incorrecta dos “primers” inviabilizará a metodologia (Brown, 2006).

Os fragmentos de DNA que vão ser amplificados não devem exceder os 3000 pares de base e idealmente deverão ser inferiores a 1000 pares de bases (Brown, 2006).

O tamanho dos “primers” é importante. Estas sequências de oligonucleótidos deverão ter tamanho suficiente para que a probabilidade de hibridar com outras regiões que não a desejada seja reduzida. A utilização de “primers” com 17 pares de base de comprimento (17-mer) ou superior torna a reacção muito específica. Por outro lado as temperaturas elevadas de hibridação podem não ser suficientes para prevenir a ocorrência de “mismatch” se os “primers” forem excessivamente longos. Na prática, “primers” de tamanho superior a 30-mer não são utilizados (Rybicki, 2001; Brown, 2006).

Muitos dos “primers” utilizados no PCR correspondem a sequências de genes que codificam factores de virulência. A maioria dos testes de diagnóstico por PCR para detecção de *Listeria monocytogenes* utiliza “primers” com sequências do gene *hly* o qual codifica a LLO ou então sequências imediatamente antes ou imediatamente depois deste gene. O conjunto de genes de virulência inclui além do gene *hly*, os genes *prfA*, *plcA*, *hlyA*, *mpl*, *actA* e *plcB*, todos presentes em *Listeria monocytogenes*,

Listeria seeligeri e *Listeria ivanovii* (Liu *et al.*, 2004). A heterogeneidade presente nos determinantes genéticos do gene *hly* das diferentes espécies de *Listeria* permitiu o desenvolvimento de “primers” específicos de *Listeria monocytogenes* (Denneer & Boychuk, 1991; Rossen *et al.*, 1991; citados por Levin, 2003). O produto do gene *actA*, é a proteína de superfície ActA responsável pela polimerização da actina necessária à propulsão e à invasão célula-célula (Levin, 2003). O gene *inlA* codifica uma proteína de superfície denominada internalina que possibilita a invasão de eritrócitos humanos (Gaillard *et al.*, 1991 citado por Levin, 2003). O produto do gene *ImaA* é um polipéptido de 21 "kilodalton" capaz de estimular uma reacção de hipersensibilidade tardia em ratos. O gene *ImaA* está presente apenas em *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii*, mas apenas a primeira o expressa (Göhmman *et al.*, 1990, citado por Levin, 2003).

Liu *et al.* (2004), utilizaram um par de “primers” (*Imo0733F* e *Imo0733R*) derivados do gene *Imo0733* específico de *Listeria monocytogenes* que codifica uma proteína semelhante a um regulador de transcrição, que é uma proteína de ligação ao DNA, importante no direccionamento da expressão genética bacteriana de forma a que esta se adapte a diferentes ambientes e geralmente são únicos para cada grupo de bactérias, específicas para cada género, espécie e subespécie e com grande potencial para diagnóstico. O gene escolhido está relacionado com a capacidade desta bactéria se adaptar ao organismo humano, hipótese corroborada pelo facto de não estar presente em nenhuma outra espécie do género *Listeria*.

A metodologia que utiliza os genes correspondentes ao 16S rRNA ou “intergenic spacers” necessita de processamento adicional tal como sequenciação dos produtos de PCR ou digestão restritiva; processo realizado por uma endonuclease de restrição, que é altamente específica, reconhecendo uma sequência particular da dupla cadeia de DNA que vai cortando, ambas as cadeias, em pontos específicos dessa zona originando fragmentos de restrição iguais, para que se possam diferenciar espécies, o que faz deles pouco úteis para análises de alimentos de rotina (Liu, 2003).

11.2.3. Temperatura

Durante cada ciclo de PCR, a mistura reaccional é submetida a três temperaturas diferentes, a de desnaturação, a de hibridação ou “annealing” e a de extensão ou síntese. A primeira (94°C-96°C), vai fazer com que haja separação da dupla cadeia de DNA, para que as cadeias possam funcionar como moldes na etapa de síntese de DNA. A segunda, corresponde à temperatura à qual os “primers” se ligam à cadeia simples de DNA que lhe servirá de molde (70°C-72°C). A terceira corresponde à

temperatura em que ocorre a síntese de DNA, cujo valor é ligeiramente inferior à temperatura óptima da *Taq* polimerase.

A temperatura de hibridação pode afectar a especificidade da reacção, uma vez que a reacção de hibridação DNA-DNA é dependente da temperatura. Se a temperatura for muito elevada, não há hibridação entre os “primers” e a cadeia molde, por outro lado se a temperatura for muito baixa pode haver ligação de um ou de ambos os “primers” a sequências que não a sequência alvo e consequentemente ocorrer “mismatched”. A temperatura ideal de hibridação, deverá ser suficientemente baixa para permitir a hibridação entre o primer e a cadeia molde, mas alta o suficiente para que não tenhamos hibridações anormais. Assim, a temperatura que devemos utilizar deverá estar 1 a 2º C abaixo da temperatura de fusão (T_f) que corresponde à temperatura em que temos dissociação da ligação entre dois nucleótidos complementares e esta temperatura pode ser obtida pela seguinte fórmula:

$$T_f = 4 \times [G+C] + 2 \times [A+T] \text{ (}^\circ\text{C)}$$

Em que o G (Guanina), o C (Citosina), o A (Adenina) e o T (Timina) correspondem ao número de cada um destes nucleótidos presentes na sequência dos *primers* (Rybicki, 2001; Brown, 2006).

A temperatura de hibridação depende dos *primers* escolhidos para essa mesma reacção e estes deverão ter T_f semelhantes ou então a hibridação será deficiente (Uyttendaele & Debever, 2006; Brown, 2006).

11.2.4. Extracção de DNA e PCR

Além dos microrganismos de interesse, a matriz quer seja alimentar, ambiental ou clínica, pode conter múltiplas substâncias que podem interferir com o processo de amplificação do DNA, talvez por inibição da DNA polimerase ou mesmo degradação ou sequestro dos ácidos nucleicos e por isso têm que ser eliminadas por métodos de extracção (Liu, 2008). As variações existentes a este nível podem convergir para sensibilidades diferentes (Tabela 8).

11.2.4.1. Substâncias inibidoras do PCR e pureza do DNA

Já foram identificadas inúmeras substâncias que inibem a acção da DNA polimerase, em fluidos corporais e fezes (ex: grupo heme, hemoglobina, etc.), em amostras do meio ambiente (ex: metais pesados, etc.) e nos alimentos (ex: compostos fenólicos, glicogénio, iões de cálcio, gordura e outros compostos orgânicos). Alguns reagentes usados para extrair o DNA, são também capazes de inibir a amplificação do DNA (Liu, 2008). O PCR ao invés de outras técnicas moleculares, como o Southern

blot ou RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) consegue funcionar mesmo com preparações de DNA menos puras (Liu, 2008).

O grupo heme (fracção não proteica da hemoglobina que lhe confere a sua cor vermelha por conter ferro) é um importante inibidor da reacção de amplificação que nunca é totalmente removido aquando da extracção do DNA, por isso temos que adicionar albumina bovina sérica (BSA) aos reagentes do PCR, que se liga ao grupo heme, impedindo a sua acção inibidora.

O NaOH e o dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate/SDS*), ajudam a diminuir o efeito inibitório da gordura e das proteínas, no PCR para pesquisa de agentes causadores de toxinfecções alimentares (Liu, 2008).

De modo a assegurar a autenticidade dos resultados obtidos por meios de biologia molecular, é importante que as substâncias que possam interferir com a reacção sejam removidas antes da reacção de amplificação, e por isso é importante a utilização de métodos eficientes e rápidos de extracção associados a protocolos eficazes de amplificação e detecção (Liu, 2008).

A avaliação da pureza de uma amostra de ácido nucleicos é muito importante e é frequentemente efectuada através de um procedimento referido geralmente como a relação A_{260}/A_{280} . A base deste teste é a lei de Lambert-Beer:

$$OD = \epsilon BC$$

Onde a absorvância da amostra (OD) é o produto do coeficiente de extinção molar (ϵ), da concentração da amostra (c), e do comprimento óptico (b). O ratio A_{260}/A_{280} que corresponde ao ratio dos valores de absorvância da amostra, lidos a 260 nm e 280 nm respectivamente, dá uma estimativa da pureza do DNA relativamente a contaminantes que absorvam na região dos UV (ultra-violeta) tais como proteínas, RNA e compostos aromáticos, sendo muito influenciado pelo pH do meio. Um ratio A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0 corresponde a DNA puro; se inferior a 1,8 indica contaminação por proteínas e se superior a 2,0 indica contaminação por RNA. Compostos, tais como iões cálcio, polissacarídeos ou gorduras que normalmente inibem a amplificação do sinal, não são detectados em leituras a A_{280} (Amagliani *et al.*, 2007).

11.2.4.2. Eficácia da extracção do DNA

O método de extracção pode influenciar a eficácia da metodologia de PCR (figura 8). Pelo procedimento convencional o isolamento dos ácidos nucleicos de *Listeria monocytogenes* era conseguido através da lise bacteriana pela lisozima, digestão das proteínas contaminantes pela proteinase K, extracção das proteínas digeridas e detritos celulares pelo fenol/clorofórmio e precipitação dos ácidos nucleicos pelo

Autor	Amostra	Primer	Limite de detecção	
			Com enriquecimento	Sem enriquecimento
Fitter <i>et al.</i> (1992) ^a	Pele de frango e queijo de pasta mole	<i>hly</i> , região 3'	10 – 10 ⁻² ufc/g (24h – 48h)	10 ⁴ ufc/g
Makino <i>et al.</i> (1995) ^a	Queijo amanteigado	LA1, LB1		10 ³ ufc/0,5g
Duffy <i>et al.</i> (1999) ^a	Carne de vaca picada	<i>hly</i>	10 ⁴ ufc/g 10h / 30°C/APT	
Knabel (2002) ^a	Comida pronta a ser consumida ("ready-to-eat-food")	Sub-unidade 16S do gene do rRNA	1-5 ufc/25g Meio selectivo	
Aznar & Alarcon (2003) ^a	Vários tipos	<i>hly</i>	Pré-enriquecimento 24h/30°C Enriquecimento 24h/37°C	
Jung <i>et al.</i> (2003) ^a	Salsicha Franckfurt	Internalina AB - <i>inlAB</i>	Pelo menos 16h 10 <i>L.monocytogenes</i> /25g	10 ⁵ <i>L.monocytogenes</i> /ml
Choi & Hong (2003) ^a	Leite	<i>hlyA</i>	16 Horas 1 ufc/0,5 ml	10 ³ ufc/0,5 ml
Liu <i>et al.</i> (2004)	Culturas estacionárias	<i>Lmo</i> 0733	BHI 10 pg de DNA	
Rodríguez-Lázaro <i>et al.</i> (2004) ^{c,d}	Fiambre com 2% de gordura	<i>hlyA</i>	8 equivalentes de genoma (detecção) 30 equivalentes de genoma (quantificação)	
Oracova <i>et al.</i> (2007) ^a			24h – F1/2 6h – F1 10 ufc/25g ^b	
Barocci <i>et al.</i> ^d (2007)	Fiambre	<i>hlyA</i>	24 h – HFB 3x10 ¹ ufc/ml 48 h – HFB 3 ufc/ml	
O'Grady <i>et al.</i> (2008)	Alimentos	<i>ssrA</i>	24 h – F1/2 4h – F1 1-5 ufc/25g ^b	

Tabela 8: Valores limites de detecção de ufc de *Listeria monocytogenes* por metodologia molecular

Legenda:

APT:água peptonada tamponada; F: Fraser

^a: In Liu (2008); ^b: Valores obtidos por PCR em tempo real; ^c: PCR em tempo real, quantitativo. ^d: Fiambre inoculado artificialmente;

etanol, o que além de demorado, expunha os técnicos do laboratório a agentes tóxicos e agressivos. Por essa razão houve uma vontade por parte da comunidade científica para desenvolver novos métodos de extracção menos agressivos e também mais eficientes no que diz respeito à lise da célula (Liu, 2008).

O DNA pode ser extraído pelo Chelex 100 (sem a utilização da proteinase K), que é uma resina permutadora de iões, desenvolvida especificamente para extracção de DNA para ampliação por PCR que se liga aos componentes celulares depois da lise celular (Rodriguez-Lázaro *et al.*, 2004). Esta resina mantém os ácidos nucleicos em suspensão, permitindo a sua fácil separação dos restantes componentes celulares ligados ao Chelex 100 por centrifugação (Liu, 2008).

Actualmente já existem diversos “kits” comerciais para rápida e eficiente purificação de DNA e RNA, embora insuficientes para os casos em é efectuada a detecção directa de *Listeria monocytogenes* presente em baixas concentrações, como frequentemente acontece com amostras de origem alimentar (Liu, 2008). Nestes casos, as amostras devem ser previamente sujeitas a protocolos que envolvam filtração e extracção (Rodriguez-Lázaro *et al.*, 2004).

No caso de produtos cárneos, a homogeneização deverá ser efectuada para maximizar a recolha de microrganismos e para isso é vantajosa a realização combinada de homogeneização, filtração através de filtro com poros de 4-micron e centrifugação, o que permite detectar por PCR baseado no gene 16S rRNA, 2 a 20 ufc de *Listeria monocytogenes* em cultura pura e 4 a 40 ufc em amostras de alimentos. Aplicando um passo de centrifugação de 1 hora removem-se muitas mais partículas de alimento e libertam-se deste muitas mais bactérias do que pelo método tradicional de homogeneização em Stomacher (Liu, 2008).

11.2.5. Controlos da reacção de PCR

Uma das grandes preocupações quando extraímos o DNA e recorremos ao PCR, é garantir que os resultados negativos se devem de facto a ausência de *Listeria monocytogenes* e que não se tratam de falsos negativos. Estes resultados podem ser devidos a interferências com a lise celular durante a extracção do DNA, degradação do material genético ou ainda por inibição directa da reacção de PCR e por isso é essencial a introdução de controlos para validar a reacção de PCR. Devem ser utilizados controlos internos e externos (Murphy *et al.*, 2007).

Os controlos externos (CE) servem para monitorizar os instrumentos, os reagentes e garantir que não há reacções cruzadas de DNA. Estes controlos têm na sua constituição os mesmos reagentes que a mistura que se quer testar, mas em vez das

amostras a serem testadas contêm, no caso do CE positivo, DNA igual ao que se quer pesquisar na amostra (por isso sofrerá amplificação pela reacção de PCR) e um outro CE, denominado de negativo, sem material genético o qual não será amplificado por PCR (Murphy *et al.*, 2007).

A existência de compostos inibidores da reacção de PCR pode ser identificada pela amplificação de uma segunda sequência alvo de ácidos nucleicos que serve de controlo interno (CI). A obtenção de um sinal positivo do segundo alvo demonstra que a amplificação foi bem sucedida, validando deste modo um resultado negativo relativamente ao alvo principal. Uma sequência normal do gene, que esteja sempre presente em todas as amostras, como por exemplo um gene endógeno do tipo “housekeeping”, pode ser usada como um CI. Iste procedimento tem a vantagem de monitorizar a integridade do DNA alvo; nos casos de amostras impropriamente colhidas, armazenadas e processadas, o CI endógeno estará ausente (ou degradado) e não resultará em resultado positivo. Uma desvantagem do CI interno é que a amplificação destas sequências endógenas pode não reflectir exatamente a amplificação da sequência alvo principal devido às diferenças nas sequências dos “primers”, no tamanho do produto amplificado e da quantidade relativa das duas sequências alvo exógena adicionada aos reagentes de PCR.

O CI utilizado pode ser sintético sem as limitações inerentes a um CI endógeno. Um exemplo de um CI sintético é o DNA de um plasmídeo ou um RNA transcrito *in vitro* com as regiões de ligação dos “primers” idênticas àquelas da sequência alvo. Estas características asseguram que a amplificação do CI e dos ácidos nucleicos alvo sejam equivalentes. Um número limitado de moléculas de CI é adicionado a cada amostra do teste e co-amplificado com sequência de DNA alvo; assim, um sinal positivo do CI assegura que houve amplificação suficiente para gerar um sinal positivo de quantidades muito pequenas do fragmento de DNA alvo. Quando introduzido na mistura de reacção pronta para sofrer amplificação, o CI pode monitorizar a amplificação e a deteção. Quando introduzido na mistura não processada o espécime, o CI vai também monitorizar a recuperação dos ácidos nucleicos durante a preparação da mistura da reacção. Ao contrário de um gene “housekeeping”, um CI sintético não pode ser usado para avaliar a integridade dos ácidos nucleicos da sequência de DNA alvo (Rosenstrauss, Wang, Chang, Debonville & Spadoro, 1998; Murphy *et al.*, 2007).

11.2.6. Importância das fases de pré-enriquecimento e enriquecimento selectivos para a realização do PCR

Para o estudo da presença de *Listeria monocytogenes* é muito vantajosa a utilização de meios de enriquecimento, de modo que as bactérias presentes em reduzidas concentrações possam multiplicar-se até quantidades possíveis de se detectarem por métodos moleculares (Liu, 2008).

Existem métodos de detecção directos, no entanto a utilização de meios de pré-enriquecimento continua a ser necessária para a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos, quando esta se encontra em quantidades reduzidas. Os métodos que não necessitam de qualquer tipo de enriquecimento são geralmente menos sensíveis (O'Grady *et al.*, 2008). Podemos ainda ter outros problemas associados à detecção de agentes patogénicos em alimentos por este método molecular, como a inibição do PCR por componentes do alimento e a amplificação de DNA de bactérias mortas, o que faz com que os métodos directos sejam realizados muito raramente (Jersek, Majstorovic, Klun & Mozina, 2005).

A incubação das amostras em meios de enriquecimento ocorre durante 24 a 48 horas e são essenciais para aumentar os teores de *L. monocytogenes* nos meios de diagnóstico de rotina. Meios como o Fraser ou a água peptonada tamponada já foram utilizados com sucesso (Liu, 2008).

Os meios de pré-enriquecimento contêm maior quantidade de amostra do alimento relativamente aos meios de enriquecimento, mas como consequência os primeiros podem não ser suficientes para remover ou diluir as substâncias inibidoras da reacção de PCR presentes na amostra do alimento (Murphy, McLauchlin, Ohai & Grant., 2007). Embora um enriquecimento de 24 horas em Fraser ½ e de 48 horas em Fraser I se tenha mostrado útil para a detecção de *Listeria monocytogenes*, estudos recentes demonstram ser mais eficaz a utilização de meios de enriquecimento não selectivos ou então meios de pré-enriquecimento para detectar bactérias que se encontrem em stress, em fase sub-letal ou lesionadas. Assim, por exemplo uma incubação de 24 horas em Fraser I/2 e de 16 horas em Fraser I de leite e outros alimentos contaminados melhorou o isolamento de *L. monocytogenes* pela metodologia de PCR (Liu, 2008).

Rantsiou *et al.* (2008), desenvolveram um protocolo de qPCR para detecção e quantificação de células viáveis de *Listeria monocytogenes* em alimentos, sem necessidade de enriquecimento, tendo a região inter-génica 16S-23S como alvo. A amplificação de genes relacionados com virulência, tais como *hly* ou *inl A*, quando efectuada sem enriquecimento prévio da amostra, não permite quantificar apenas as células viáveis, e por isso escolheram genes de RNA ribossomal que dão indicação directa da viabilidade de *Listeria monocytogenes*. A quantificação foi possível a partir

de 10^4 - 10^5 ufc/ml. Com enriquecimento (uma noite) a presença de *Listeria monocytogenes* pode ser detectada a partir de 10 ufc/ml ou g. Esta metodologia tem elevada especificidade e pode ser preconizada em diversas matrizes alimentares.

11.2.7. Estudo dos produtos de PCR

Depois da amplificação das cadeias de DNA alvo, temos várias opções para estudar este produto e assim obtermos informação sobre a presença ou não da sequência de DNA alvo relativamente à qual os “primers” foram seleccionados. As técnicas mais importantes para esse fim são a electroforese em gel, clonagem dos produtos de PCR e sequenciação dos produtos de PCR (Brown, 2006).

A electroforese em gel (Figura 13) é uma técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas num determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. A molécula de DNA por ter carga negativa, migra para o pólo positivo. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, pois as de menor massa irão migrar mais rapidamente do que as de maior massa. Em alguns casos, o formato das moléculas também importa, pois algumas terão maior facilidade para migrar pelo gel. A electroforese permite separar o DNA em fragmentos, a partir do seu peso molecular. Neste caso, a agarose é utilizada como gel para a electroforese. A agarose é um polissacarídeo que forma uma rede que segura as moléculas durante a migração. Dependendo da concentração de agarose, tem-se uma diferença no gradiente de separação. Para preparar um gel de agarose, faz-se a mistura entre o pó de agarose e a solução tampão TBE (Tris/Borato/EDTA). Quando a mistura arrefece o gel fica duro. Este endurecimento é feito num local apropriado, o mesmo local onde será feita a corrida da amostra. É colocado um pente no gel durante o endurecimento, que vai criar poços que serão utilizados para a colocação das amostras. Além do referido anteriormente, é adicionado brometo de etídio, que é um corante fluorescente que se vai intercalar entre as bases de DNA, e sob a radiação ultra-violeta permite a visualização do DNA (Brown, 2006). Além das amostras, temos que utilizar um marcador, que é uma mistura de fragmentos de DNA de tamanho conhecido, com as quais comparamos os produtos do PCR em estudo (Vierstraete, 1999).

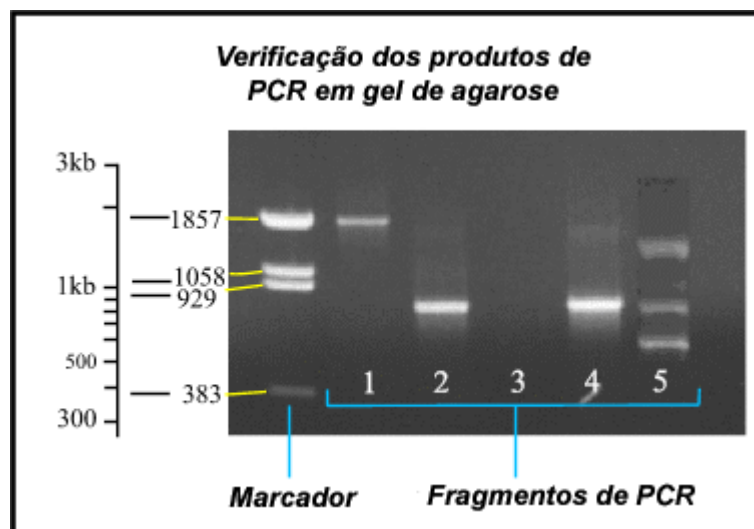


Figura 13: Estudo dos produtos de PCR através de electroforese em gel (adaptado de Vierstraete, 1999).

A electroforese em gel de agarose permite identificar os produtos de PCR através do seu tamanho. Sabe-se no entanto, que por vezes durante a reacção de PCR há amplificação de locais da cadeia para além da sequência alvo de oligonucleótidos. Para se confirmar a identidade dos produtos amplificados podemos utilizar diferentes metodologias (Uyttendaele & Debevere, 2006):

- a. **“Southern-Blot”**, é um método usado para confirmação da presença de uma sequência de DNA em uma amostra de DNA. Combina a electroforese em gel de agarose para a separação por tamanho das bandas de DNA com a transferência para uma membrana de nitrocelulose ou nylon onde posteriormente haverá hibridação com uma sonda. A sonda de DNA é marcada de forma que permita a sua detecção e essa marcação é normalmente feita através da utilização de átomos radioactivos ou pela ligação à sonda de corantes fluorescentes ou cromogénicos. Se a sequência procurada não estiver presente na amostra não haverá hibridação com a sonda. Por outro lado, se a hibridação ocorrer, a sonda poderá ser detectada por exposição a raios X. Outros métodos (isto é, “western blot”, “northern blot”, “southwestern blot”) empregam princípios similares, mas utilizam RNA ou proteína (Molina & Tobo, 2004).
- b. Hidrólise do produto amplificado com uma endonuclease de restrição. A técnica de **RFLP’s** (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”) baseia-se na hidrólise do DNA com endonucleases de restrição e posterior separação,

por electroforese, dos fragmentos, que correspondem a padrões de restrição específicos, que possuem as sequências de reconhecimento das enzimas usadas.

- c. Produção de um fragmento interno usando o **Nested – PCR** ou **Semi – Nested – PCR**, que emprega uma segunda etapa de amplificação com um par de “primers” internos aos utilizados na primeira etapa e visa aumentar a sensibilidade e especificidade da metodologia de PCR (Molina & Tobo, 2004).
- d. Sequenciação para identificação dos produtos de PCR (Molina & Tobo, 2004).

12. Variações de PCR

O aparecimento da metodologia acoplada a PCR veio revolucionar a biologia molecular, e trazer maior rapidez e eficiência relativamente às técnicas anteriores. A técnica foi evoluindo, surgindo depois diversas metodologias resultantes da alteração do PCR clássico (Molina & Tobo, 2004).

A técnica de Transcrição-Reversa-PCR (RT-PCR), utiliza uma enzima denominada de transcriptase reversa que converte uma amostra de RNA em DNA complementar (cDNA) antes da etapa de amplificação por PCR, permitindo a análise de RNA (Molina & Tobo, 2004).

O PCR *Multiplex*, utiliza *primers* diferentes que permitem detectar múltiplas sequencias alvo numa mesma amostra em simultâneo e veio trazer melhorias significativas relativamente à técnica anterior (Lawrence & Gilmor, 1994).

Estamos a entrar numa nova era, em que o PCR vai além de uma análise qualitativa, começando a ser possível quantificar os produtos de PCR.

O PCR em tempo real permite a amplificação, a detecção simultânea e a quantificação das sequências amplificadas (Molina & Tobo, 2004). Rodríguez-Lázaro *et al.* (2005), descreveram um PCR em tempo real, quantitativo para detecção de *Listeria monocytogenes* baseado na co-amplificação de um fragmento do gene alvo *hly* e de um controlo interno de amplificação (IAC). A aplicação de sondas fluorescentes para a detecção dos produtos de PCR, em conjunto com equipamento adequado, é capaz de combinar a amplificação e a detecção de sequências específicas de DNA. O fundamento desta metodologia é a quantificação da fluorescência emitida durante a reacção, que serve de indicador de produção de produtos resultantes da amplificação em cada ciclo reaccional. Esta metodologia elimina a necessidade de realização de electroforese para detecção dos produtos de PCR e dá os resultados em suporte informático (Uyttendaele & Debevere, 2006). Existem diferentes técnicas (Figura 14) de detecção da fluorescência do DNA em tempo real, das quais se destacam:

a. SYBR – Green

Esta molécula, “SYBR – Green”, vai-se ligar especificamente à dupla cadeia de DNA. No início a fluorescência é reduzida por não se encontrar ligado ao DNA, mas durante o alongamento, quantidades crescentes desta sonda vão-se ligando à dupla cadeia de DNA (Uyttendaele & Debevere, 2006).

b. Taqman

Além dos dois “primers” convencionais, que são específicos para a sequência-alvo, um terceiro “primer” é desenhado para se ligar especificamente a um local no meio da sequência alvo. Este *primer* é marcado com dois fluoróforos, um “Reporter” (R), na extremidade 5’ e um “Quencher” (Q), na extremidade 3’. Neste caso é utilizada a actividade 5’-nuclease da DNA-*Taq*-Polimerase para hidrolizar a sonda hibridada ligada ao DNA alvo. A sonda *Taq* contém o “Reporter” fluorescente na extremidade 5’, cuja emissão de fluorescência é eliminada pelo fluorocromo “Quencher” da extremidade 3’ quando o “Repórter” e o “Quencher” estão próximos um do outro, isto é, separados apenas por alguns oligonucleótidos. Então enquanto a sonda Taqman está intacta, não há produção de sinal fluorescente. Durante a fase de “annealing” ambos os “primers” (os não marcados) e a Taqman vão emparelhar com a sequência complementar do DNA alvo. À medida que o alongamento da cadeia vai ocorrendo, pela actuação da DNA – *Taq* - Polimerase que adiciona oligonucleótidos para sintetizar a dupla cadeia de DNA, ocorre em simultâneo a degradação da sonda Taqman pela actividade 5’ – nuclease da DNA – *Taq* – Polimerase e deste modo há separação entre o “Reporter” e o “Quencher” e a fluorescência ocorre. A fluorescência pode depois ser medida no final de cada ciclo e deste modo a reacção de PCR pode ser acompanhada em tempo real (Uyttendaele & Debevere, 2006).

c. “Molecular Beacons”

São sondas de DNA com estrutura “Stem-and-Loop”. A porção em hélice da sonda “beacon” é complementar da sequência da porção alvo da molécula de DNA. Numa das extremidades da sonda está ligado um fluoróforo (“Reporter”) e na outra extremidade um bloqueador do fluoróforo (“Quencher”). Na ausência de sequências complementares na cadeia alvo da sonda *beacon*, não há fluorescência; se pelo contrário existir emparelhamento entre o DNA alvo e a sonda, então dá-se a abertura da estrutura, o que faz aumentar a distância entre o “Reporter” e o “Quencher”, e assim surge a fluorescência. Podemos utilizar diferentes *beacons* com diferentes

fluoróforos para detecção em simultâneo, de diferentes produtos de PCR (Uyttendaele & Debevere, 2006).

d. “Light Cycler”

Este método utiliza duas sondas. Uma sonda contém na sua extremidade 3’ um fluoróforo dador (D) cujo espectro de emissão se sobrepõe ao espectro de excitação do fluoróforo receptor (A) ligado à extremidade 5’ da outra sonda. A excitação do dador resulta em transferência de energia por ressonância fluorescente (FRET) para o receptor que depois adquire fluorescência. Quando em solução as duas sondas, D e A, estão separadas e porque a FRET depende do espaço existente entre ambas, existe apenas uma fluorescência de fundo. Depois durante a reacção de PCR, na fase de emparelhamento, vai haver hibridação entre as sondas e as sequências de DNA alvo que lhe são complementares, ambas as sonda aproximam-se e assim dá-se a FRET cuja fluorescência emitida é medida (Uyttendaele & Debevere, 2006).

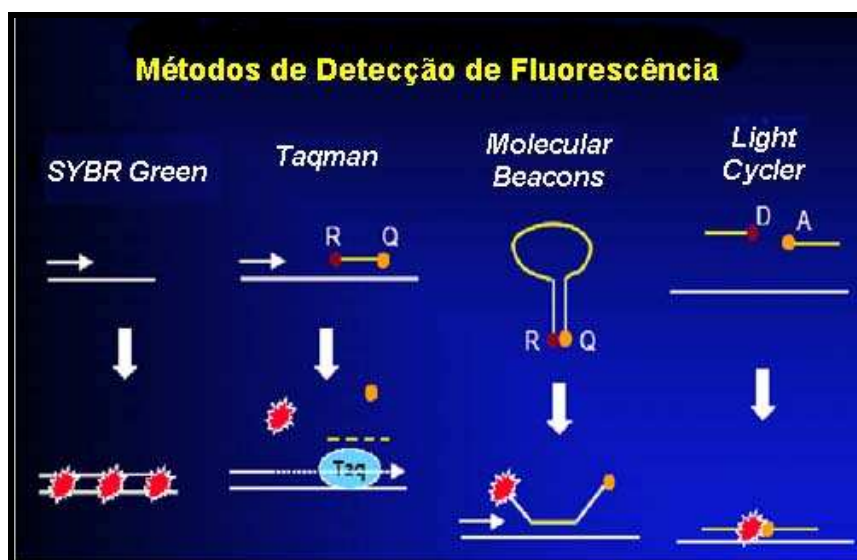


Figura 14: Métodos de detecção de fluorescência aplicados à metodologia de PCR em tempo real (Adaptado de <http://www.slideshare.net/labimuno/realtime-presentation/>).

13. Limites e legislação

A legislação europeia (Regulamento 1441/2007), estabelece que em alimentos prontos para consumo, os teores de *Listeria monocytogenes*, devem ser inferiores a

100 ufc/g quando dentro do período de validade do produto e ausente no mesmo tipo de alimento para certos grupos alvo de consumidores considerados de risco. A legislação é também aplicável aos alimentos prontos para consumo, nos quais o crescimento da bactéria não é susceptível de ocorrer, e não destinados a lactentes nem para fins medicinais, cujo teor deverá ser inferior a 100 ufc/g.

A *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF), concluiu que 100 ufc de *Listeria monocytogenes* por g de alimento no momento em que é consumido é aceitável para a maioria dos consumidores. A legislação Europeia foca-se no controlo do crescimento de *Listeria monocytogenes* durante o período de validade do alimento e não na ausência total (excepto para os grupos de risco) e é por isso considerada por muitos microbiologistas, mais prática e mais sensata que a legislação Norte Americana (Anónimo, 2007d), segundo a qual a tolerância é de zero para a presença de *Listeria monocytogenes*. O “United States Department of Agriculture” (USDA) obriga a que os produtores de alimentos à base de carne façam uma monitorização regular dos produtos bem como dos locais de produção. A legislação europeia prevê ainda que possam ser adoptados testes alternativos validados por protocolos internacionalmente aceites (O’Grady *et al.*, 2008).

14. Análise de Risco

O motivo pelo qual as autoridades dos diferentes países tomam fortes medidas de prevenção relativamente a *Listeria monocytogenes* deve-se à elevada taxa de mortalidade que provoca no ser humano. É importantíssimo do ponto de vista de saúde pública identificar o alimento contaminado e removê-lo com a máxima brevidade da cadeia de distribuição. Há que perceber quais os géneros alimentícios que mais frequentemente estão associados à listeriose e o modo como se transmite ao Homem, de modo a prevenir casos futuros (McLauchlin *et al.*, 2004).

A análise de risco associada à cadeia alimentar, é uma abordagem lógica, sistemática e transparente de processar informação sobre as doenças de origem alimentar de forma a identificar os perigos e os riscos associados aos diferentes alimentos (WHO, 2004). Esta análise permite estimar a probabilidade de ocorrer doença numa determinada população. A análise de risco compreende a avaliação, a gestão e a comunicação do risco. Avaliação de risco pretende dar resposta às perguntas “Que perigos?”, “Quando são avaliados e com que método?”, “Qual o grau de incerteza?”, “Quem é afetado?”. A gestão de risco pretende determinar como os valores influenciam a selecção e a execução de políticas alternativas. Por fim, a

comunicação de risco não só promove a participação das partes interessadas como possibilita a troca de informação e de opiniões (Swaminathan & Gerner-Smith, 2007).

Uma nova abordagem da análise de risco implica a participação activa do consumidor nos vários estágios do processo de análise de risco, implementação de procedimentos funcionais e estruturais melhorados de gestão de risco e uma melhoria da comunicação de risco com os consumidores durante todo o processo de análise de risco. Tudo isto deverá ter aplicabilidade em toda a União Europeia (Swaminathan *et al.*, 2007).

Para aceder à análise de risco, a FAO/WHO (2004) determinou ser necessário:

- I. Estimar o risco dos consumidores dos diferentes grupos populacionais relativamente à susceptibilidade de cada um:
 - a probabilidade de se ficar doente por ingestão de *Listeria monocytogenes* é maior em populações mais susceptíveis (grávidas, recém-nascidos, imunodeprimidos e idosos) do que em adultos saudáveis. Os idosos (que abrange os indivíduos com idade superior a sessenta anos) são 2,4 vezes mais susceptíveis e os recém nascidos 1,4 vezes mais susceptíveis;
- II. Estimar o risco da presença de *Listeria monocytogenes* em alimentos em que se possa multiplicar e nos que em determinadas condições de armazenamento e no período de validade não permitam o seu crescimento:
 - a maioria dos casos de Listeriose é causada pela ingestão de elevadas quantidades de *Listeria monocytogenes*. A eliminação destas concentrações bacterianas elevadas aquando do consumo deverá prevenir muitos casos de doença;
- III. Estimar o risco da presença de *Listeria monocytogenes* em alimentos tendo em conta o intervalo de ausência em 25g até 10^3 ufc/g ou então não exceder os valores determinados até ao consumo dos alimentos:
 - o potencial de multiplicação de *Listeria monocytogenes*, em alimentos cozinhados prontos a consumir durante a refrigeração tem um enorme peso no risco que estes alimentos podem representar. Naqueles alimentos que permitem o crescimento desta bactéria, a existência de 10^2 a 10^3 ufc aumentará o risco de listeriose.

Algumas das opções chave que se sabem ser efectivas no combate de *L. monocytogenes* devem ser identificadas e sujeitas a análise de risco. *Listeria monocytogenes* pode causar problemas que devem ser combatidos através de medidas de higiene. Assim, as autoridades competentes e a indústria deverão controlar a existência deste microrganismo através da aplicação adequada e

verificação das boas práticas de higiene e implementação de HACCP (FAO/WHO, 2004). Geralmente o risco associado ao consumo de carne e de produtos dela derivado está apenas relacionado com a presença de agentes patogénicos, e as bactérias patogénicas não fazem *per se* parte da flora de decomposição da carne, a sua ocorrência deve-se a contaminações da carne ainda crua ou então pós – processamento (López *et al.*, 2006).

A criação de um modelo matemático capaz de prevenir a relação dose-efeito relativamente a *Listeria monocytogenes* tem sido objecto de estudo para se saber qual a dose mínima infectante a partir da qual teríamos doença clínica (McLauchlin *et al.*, 2004). Têm sido utilizados diversos modelos matemáticos que poderiam eventualmente dar esta resposta e a variabilidade quanto à susceptibilidade dos diferentes grupos de população é tão díspar que põe em causa a possibilidade de descrever toda a população através de apenas uma curva dose-efeito. Estas limitações fazem com que estes modelos matemáticos não sejam amplamente utilizados em análise de risco (McLauchlin *et al.*, 2004).

De acordo com McLauchlin *et al.* (2004) a relação dose-efeito pode ser formulada baseada em duas hipóteses através de duas curvas. Na primeira hipótese a doença é causada pela ingestão de uma ou algumas doses elevadas de *L. monocytogenes*; ou então na segunda hipótese, a doença resulta de uma exposição frequente ou continuada a *Listeria monocytogenes*, o que faz baixar a curva dose – efeito para níveis mais baixos.

Mataragas, Skandamis & Drosinos (2008), avaliaram os graus de risco da carne de porco e de aves de capoeira através de um “software” baseado no Excel, o qual tenta responder a várias perguntas relativas à probabilidade de exposição a um perigo, à susceptibilidade da população em relação a esse perigo, à severidade da doença causada pelo perigo e à probabilidade do alimento conter uma dose infectante desse mesmo agente. O risco foi caracterizado como baixo, médio e alto. O risco para a saúde também foi estimado separadamente, para populações de baixo risco e de risco elevado. Um risco baixo foi obtido para *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enterohemorrágica em populações de baixo-risco. Um risco moderado foi calculado para *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em produtos processados de carne de porco ou aves (prontos a serem consumidos ou que necessitam apenas de ser reaquecidos) e em produtos parcialmente cozinhados de carne de porco, também numa população de baixo-risco. As avaliações com risco elevado identificadas foram associadas ao desrespeito pela temperatura em carne de porco e/ou carne de aves com vida útil prolongada e contaminadas de forma cruzada

por *L. monocytogenes* (apenas para a população de risco elevado), *E. coli* enterohemorrágica (somente para a população de risco elevado) ou *S. aureus* (toda a população). Estes resultados podem constituir uma fonte de informação para a avaliação dos perigos durante a aplicação de um sistema de gestão da segurança alimentar (Mataragas *et al.*, 2008).

Parte Experimental

Avaliação da qualidade higio-sanitária da carne de frango: Pesquisa de *Listeria monocytogenes* por PCR

Objectivos e justificação do tema

Listeria monocytogenes é um importante agente de doença de origem alimentar associada a elevadas taxas de mortalidade (IFT, 2004; OIE, 2005; EFSA, 2007a; Chaturongakul *et al.*, 2008; O'Grady *et al.*, 2008).

A carne de frango é consumida em larga escala pela população portuguesa (Lima, 2008b; INE, 2008) estando documentados teores elevados desta bactéria em aves de capoeira, realizou-se este estudo que tem como objectivo avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em peitos de frango utilizando para isso a metodologia da reacção em cadeia da polimerase (PCR), avaliando-se previamente o limite de detecção da metodologia adoptada, e simultaneamente a contribuição do equipamento da sala de desmancha (cone do carrossel de cones, bancada e fundo da caixa de plástico de transporte de carcaças) para a contaminação das carcaças por *Listeria monocytogenes*.

Pretende-se avaliar a qualidade higio-sanitária da carne de frango tendo como indicador de higiene do processo a contagem de Enterobacteriaceae.

Materiais e Métodos

1. Colheita e selecção das amostras de peitos de frango

Num matadouro, em diferentes dias de abate, foram seleccionadas ao acaso 4 carcaças por bando, provenientes de diferentes criadores. As amostras foram colhidas de um total de 13 bandos diferentes. Foram colhidas 16 amostras de bandos de produção biológica, 20 amostras de bandos de produção extensiva e 16 amostras de bandos de produção intensiva. As aves foram abatidas de acordo com as práticas normais do matadouro e depois arrefecidas rapidamente em túnel de ar frio ($1\pm1^{\circ}\text{C}$). Após 24 horas, foi efectuada a desmancha manual das carcaças seleccionadas em carrossel de cones e recolhidos os peitos para análise que depois foram transportados em camião refrigerado a 4°C , em circuito normal de distribuição até ao laboratório.

Em todas as amostras recolhidas ($n=52$) foram efectuadas contagens de Enterobacteriaceae e de *Listeria monocytogenes*. Realizou-se em paralelo a pesquisa

de *Listeria monocytogenes* pelo método clássico e pelo método de biologia molecular PCR.

2. Colheita de amostras de equipamento da sala de desmancha

Colheu-se uma amostra de um cone do carrossel de cones, cuja área aproximada era de 930 cm², uma amostra de uma das bancadas (1000 cm²) da sala de desmancha e uma amostra do fundo (210 cm²) das caixas de plástico de transporte das carcaças para o que se usou uma compressa estéril humedecida com solução de neutralização (GE Healthcare, USA).

3. Preparação das amostras de peito de frango para contagem de Enterobacteriaceae

Pesou-se de forma asséptica 10 g de peitos de frango em saco de “stomacher” estéril e adicionou-se 90 ml de Triptona Sal (Scharlau Chemie, Barcelona) efectuando-se a sua homogeneização durante dois minutos no stomacher (diluição 10⁻¹). Com uma pipeta estéril transferiu-se 1 ml da suspensão inicial para 9 ml de Triptona-Sal (diluição 10⁻²).

4. Preparação de amostras de equipamento da sala de desmancha

As compressas humedecidas foram transferidas de forma asséptica para 100 ml de meio de enriquecimento Fraser 1/2 (Scharlau Chemie, Barcelona) e homogeneizadas no “stomacher”. O restante procedimento analítico foi idêntico ao das amostras de peito de frango (ver ponto 6 e 7) para a pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes*.

5. Contagem de Enterobacteriaceae em amostras de peito de frango

A contagem da Enterobacteriaceae em alimentos foi feita pelo método microbiológico ISO 21528-2: 2004 (Figura 15).

Semeou-se por incorporação em duplicado 1ml de cada uma das diluições realizadas com Triptona Sal (10⁻¹ e 10⁻²) em caixas de Petri previamente identificadas. Adicionou-se em seguida 15 ml de *violet red bile glucose agar* (VRBG, Scharlau Chemie, Barcelona) fundido (46⁰±2⁰ C) a cada uma das caixas de Petri e agitou-se cuidadosamente. Após solidificação completa do meio, as placas de Petri incubaram durante quarenta e oito horas a 37⁰±1°C. Contaram-se as colónias características presentes (mucosas, cor rosa a vermelho com ou sem halo de precipitação de sais

bilíares, ou incolores,) em cada uma das placas semeadas, com pelo menos dez colónias características em cada uma delas.

O resultado foi obtido de acordo com a fórmula A (Norma Portuguesa 4405), expresso em ufc/g e depois convertido em log ufc/g.

$$A) \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1n_2) d}$$

Legenda:

ΣC : somatório das colónias contadas em duas placas de duas diluições sucessivas e que contenham pelo menos dez colónias características.

n_1 : número de placas consideradas na primeira diluição.

n_2 : número de placas consideradas na segunda diluição.

d : factor de diluição correspondente à primeira diluição considerada.

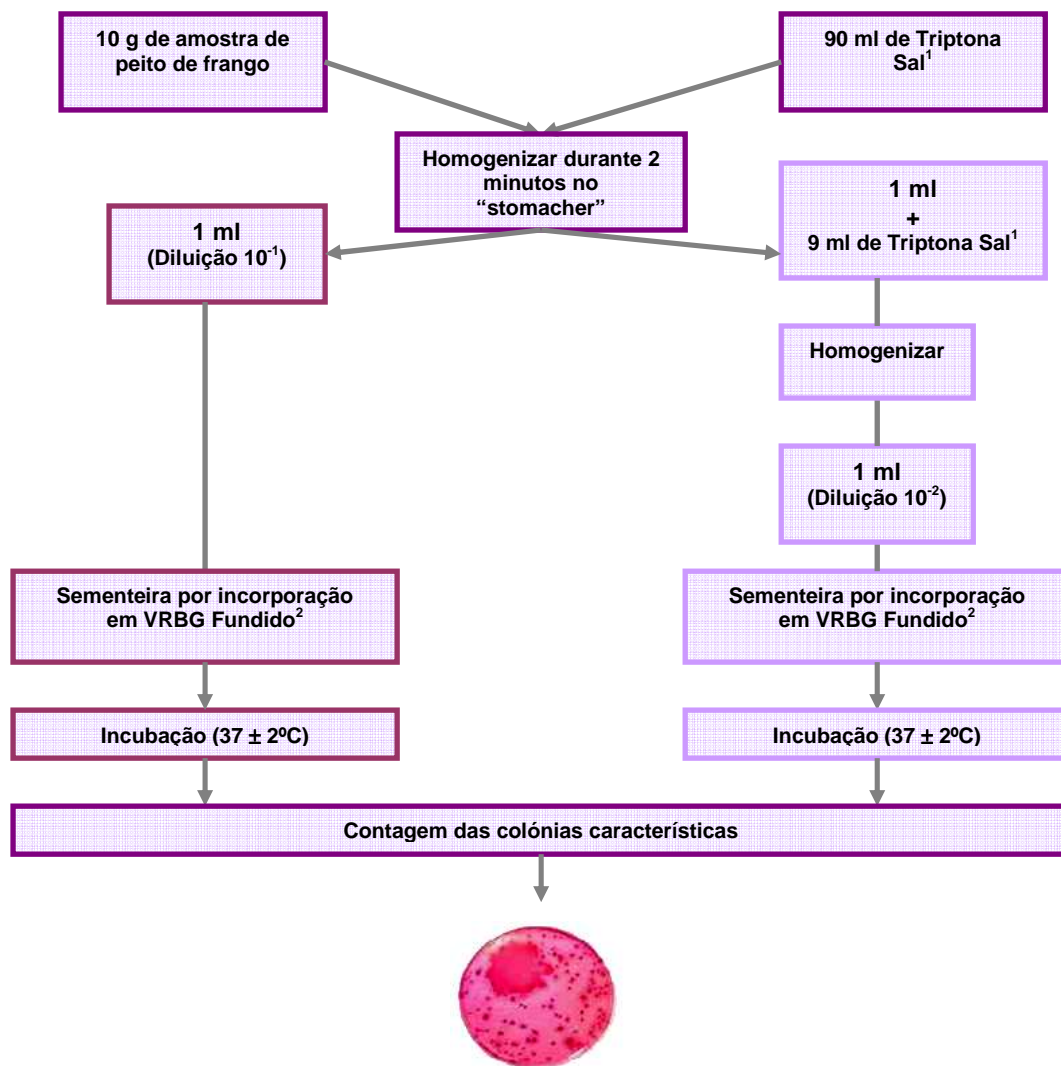


Figura 15: Esquema da metodologia microbiológica para contagem de Enterobacteriaceae em alimentos (adaptado da Norma ISO 21528-2: 2004).

Legenda:

¹: **Tryptona Sal**: meio de cultura desidratado, com caseína enzimática hidrolisada (1,00g/l), cloreto de sódio (8,50g/l) e pH final (a 25°C) igual a 7.0 ± 0.2 . Para preparação do meio dissolveu-se 9.5 gramas em 1000ml de água destilada e aqueceu-se para dissolver o meio completamente. Foi depois esterilizado em autoclave a 15lbs de pressão, a 121°C durante 15 minutos.

² **VRBG**: “VIOLET RED BILE AGAR”, com glicose, bilis e corante violeta. Baseia-se no meio de MacConkey para detecção e enumeração de Enterobacteriaceae que são bactérias Gram-negativas tolerantes a bilis. Neste meio, a lactose é substituída pela glicose. Tem na sua constituição glicose monohidratada (10.00 g/l), cloreto de sódio (5g/l), sais biliares (1,5 g/l), Violeta Cristal (0.002g/l), digestão pancreática de gelatina (7g/l), extrato de levedura (3 g/l), vermelho neutro (0,03g/l) e Agar (15g/l).

6. Pesquisa e Identificação de *Listeria monocytogenes* em amostras de peito de frango

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos foi realizada de acordo com o método descrito pela ISO 11290:1 (Figura 16). A 25g de amostra de peito de frango colhida de forma asséptica, adicionou-se 225 ml de meio de Fraser ½ (Scharlau Chemie, Barcelona), tendo sido efectuada a homegenização em Stomacher 400 (Lab-Blender) durante cinco minutos. Realizou-se um pré-enriquecimento em durante 24 horas a 30°C após o que se fez o enriquecimento em meio de Fraser I, que foi posto a incubar durante 48 horas a 37°C. O isolamento foi efectuado a partir dos meios Fraser ½ e Fraser I através de sementeira à superfície, com ansa, no meio Agár *Listeria* de acordo com Ottaviani-Agosti (ALOA, AES Chemunex, Barcelona), que incubou a 37°C durante 24 horas. Para confirmação das colónias suspeitas de *Listeria monocytogenes* foi efectuada repicagem de cinco colónias características (azuis turquesa com halo opaco) para meio de TSA (Tryptona Soja Agar, Scharlau Chemie, Barcelona) seguida de incubação a 37°C durante 24 horas. Seguiu-se a observação por transiluminação de Henry, das colónias que cresceram no meio TSA. As colónias que apresentaram uma luminescência azul foram submetidas a testes da catalase e oxidase. Para identificação e confirmação utilizámos o teste bioquímico APIListeria, (bioMérieux, França) realizado de acordo com as instruções do fabricante a partir das colónias catalase positivas e oxidase negativas. As colónias características foram coradas pelo método de Gram para observação da morfologia bacteriana.

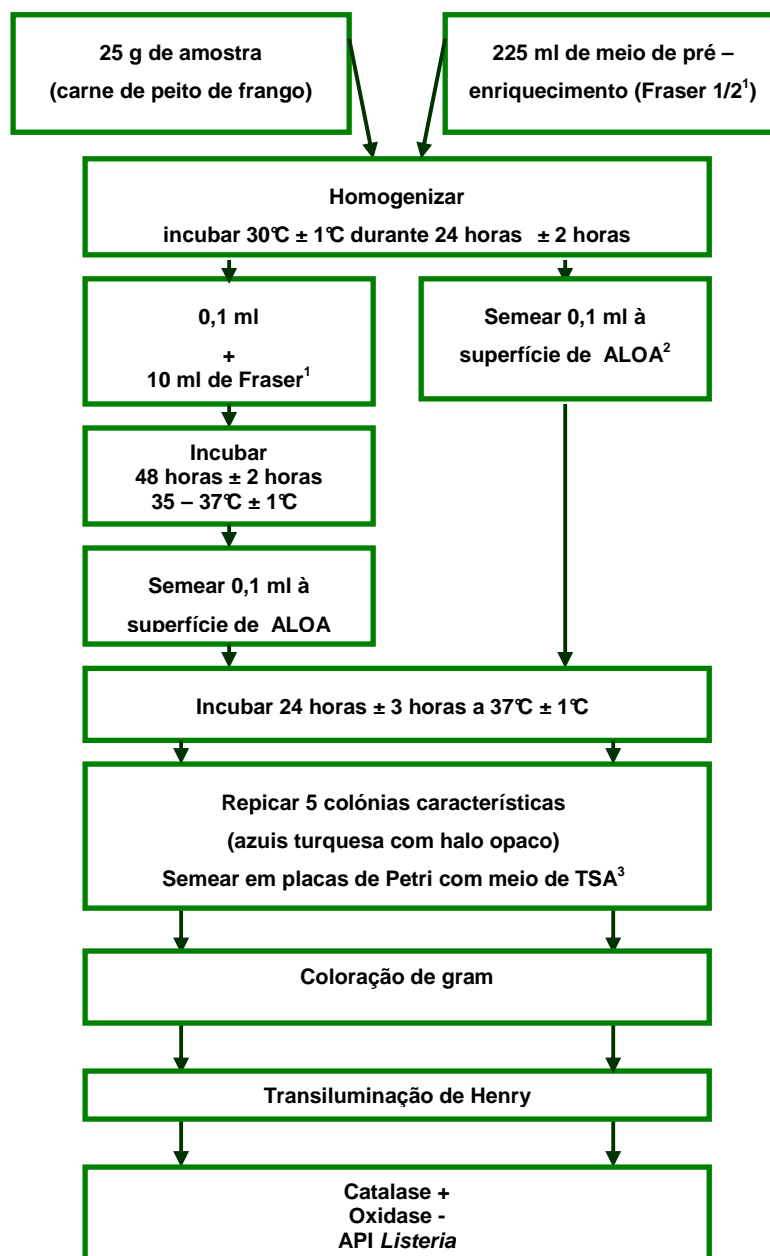


Figura 16: Diagrama do método ISO 11290:1 para pesquisa e identificação de *Listeria monocytogenes* em alimentos.

Legenda:

¹ O meio de **Fraser**^{1/2} e **Fraser I** (por adição de suplemento ao Fraser 1/2) são meios de enriquecimento para *Listeria* spp. em amostras alimentares e do meio ambiente. Todas as espécies do género *Listeria* hidrolizam a esculina a esculetina, que reage com os iões de ferro provocando um enegrecimento do meio. A adição de citrato férrico de amónio melhora o crescimento de *L. monocytogenes*. O cloreto de lítio em conjunto com o ácido nalidixico e a acriflavina do suplemento inibem o crescimento de outras bactérias que podem hidrolizar a esculina. A concentração elevada de cloreto de sódio inibe o crescimento de *Enterococci*. Triptona, peptona e extracto de levedura fornecem nitrogénio, vitaminas, minerais e aminoácidos (ISO 11290-1). ² **ALOA** (Agar *Listeria* de acordo com Ottaviani e Agosti) é um meio cromogénico para isolamento de *Listeria* que permite diferenciar *L. monocytogenes* das restantes espécies (ISO 11290-1). ³ **TSA**, consiste em Agar, Triptona de soja e extracto de levedura, é formulado para o isolamento e confirmação de *Listeria monocytogenes* através da transiluminação de Henry de alimentos (ISO 11290-1).

7. Contagem de *Listeria monocytogenes*

A contagem da *Listeria monocytogenes* em alimentos foi realizada de acordo com o método descrito pela ISO 11290:2 (Figura 17). Semeou-se em duplicado 0,1 ml da

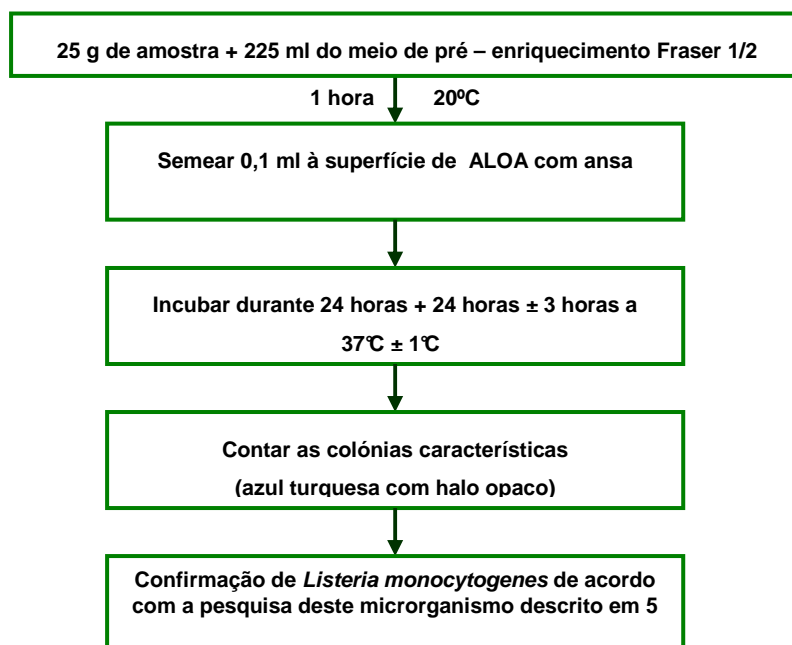


Figura 17: Diagrama do método ISO 11290:2 para contagem de *Listeria monocytogenes* em alimentos.

suspensão preparada tal como descrita em 6 para pesquisa, à superfície com ansa, seguida de contagem das colónias suspeitas (azuis turquesa com halo opaco) após incubação a 37°C durante 24 a 48 horas. A confirmação de *Listeria monocytogenes* efectuou-se de acordo com a pesquisa deste microrganismo descrito em 6. Os resultados foram expressos em log ufc/g.

8. Optimização e validação da metodologia molecular de reacção em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa de *Listeria monocytogenes*. Limite de detecção.

Realizaram-se dois ensaios que eram repetições independentes de inoculações (como recomendado pela ISO 16140), em que cada uma de duas amostras de peito de frango foram artificialmente inoculadas, nas quais foi previamente confirmada a ausência de *Listeria monocytogenes* em 25g de acordo com a metodologia descrita

em 5. A pesquisa de *Listeria monocytogenes* em 25g foi realizada em ambas as amostras.

8.1. Estirpe utilizada para as inoculações

Utilizou-se uma estirpe de *Listeria monocytogenes* 4a CECT 934 conservada a 4°C no meio de TSA (Tryptona soja agar, Scharlau Chemie, Barcelona). Esta cultura foi renovada semanalmente. Antes de ser utilizada no ensaio de inoculação para otimização e validação da metodologia PCR para pesquisa de *Listeria monocytogenes* procedeu-se à repicagem da estirpe para tubos com meio de BHI (Brain Heart Infusion, Scharlau Chemie, Barcelona), incubando durante 24 horas a 37°C e em seguida semeou-se por estria em placas de TSA as quais foram incubadas por um período de 24 horas a 37°C de modo a obterem-se colónias isoladas.

8.2. Preparação das suspensões para serem inoculadas

Selecionou-se uma colónia de *Listeria monocytogenes* 4a de uma placa de TSA e inoculou-se em 10 ml de meio de BHI. Incubou-se a suspensão durante 24 horas a 37°C. Segundo Rantsiou *et al.*(2008) a incubação de uma colónia de *Listeria monocytogenes* 4a em BHI durante 24 horas a 37°C, origina aproximadamente 10⁹ células/ml (Figura 18).

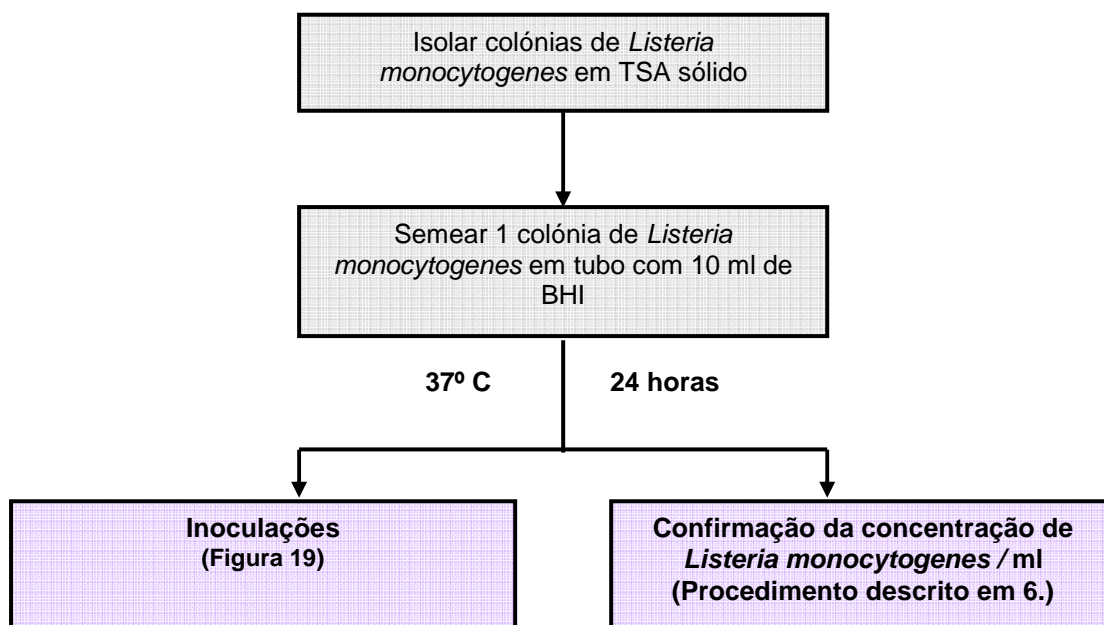


Figura 18: Protocolo de preparação da suspensão bacteriana de *Listeria monocytogenes* 4a em BHI para posteriores inoculações e confirmação do nº de bactérias/ml da suspensão.

Efectuaram-se diluições seriadas da suspensão de BHI após incubação, procedendo-se à contagem de *Listeria monocytogenes* 4a de acordo com o procedimento descrito em 6, para confirmação da concentração bacteriana de *Listeria monocytogenes* 4a.

8.3. Inoculação das amostras de peito de frango

Foi realizado um ensaio de inoculação em duas amostras de peito de frango para avaliação da metodologia de PCR. Em cada um de quatro sacos de Stomacher colocou-se 25g de frango e 225 ml de Fraser I/2, os quais foram inoculados com diferentes volumes da suspensão bacteriana previamente preparada e posteriormente homogeneizados no Stomacher 400 (Lab – Blender) durante cinco minutos.

A suspensão inicial (com 10^9 células/ml aproximadamente) foi diluída a 10^3 . No saco nº 1 introduziram-se 25µl da suspensão (para se obter um teor de bactérias igual a aproximadamente 1-50 bactérias). No saco nº 2, inoculou-se 75µl de modo a obter-se um teor de aproximadamente 50-100 bactérias, no saco nº 3 inoculou-se 150µl para se obter um teor de aproximadamente 100-200 bactérias. No saco nº4 inoculou-se 25µl da suspensão inicial (10^9 células/ml) para se obter um teor de bactérias igual a aproximadamente $1-50 \times 10^6$ bactérias. Estes sacos (nº 1, 2, 3, 4) foram homogenizados em Stomacher durante 4 minutos). Preparou-se o saco nº5 testemunha, no qual não se fez qualquer inoculação. Deste último saco retiraram-se 10 ml para tubos de ensaio (n= 4) onde se inocularam concentrações de bactérias iguais às inoculadas nos sacos de Stomacher. Estes tubos não foram incubados.

Os sacos de Stomacher com suspensão incubaram 24 horas a 30°C. Após a incubação, retirou-se de cada saco 0,1 ml de suspensão e adicionou-se a 10 ml de Fraser I que incubou durante 48 horas a 37°C.

Após cada fase de enriquecimento selectivo nos meios de Fraser ½ durante 24 horas a 30°C e Fraser I durante 24+24 horas a 37°C, retirou-se 1 ml de suspensão (em duplicado) para tubo de Eppendorf e congelou-se a -20°C para posterior extracção de DNA (ver ponto 8.2). Foi realizado o mesmo procedimento de colheita e conservação de aliquota de amostra para os tubos de 10 ml de suspensão sem incubação.

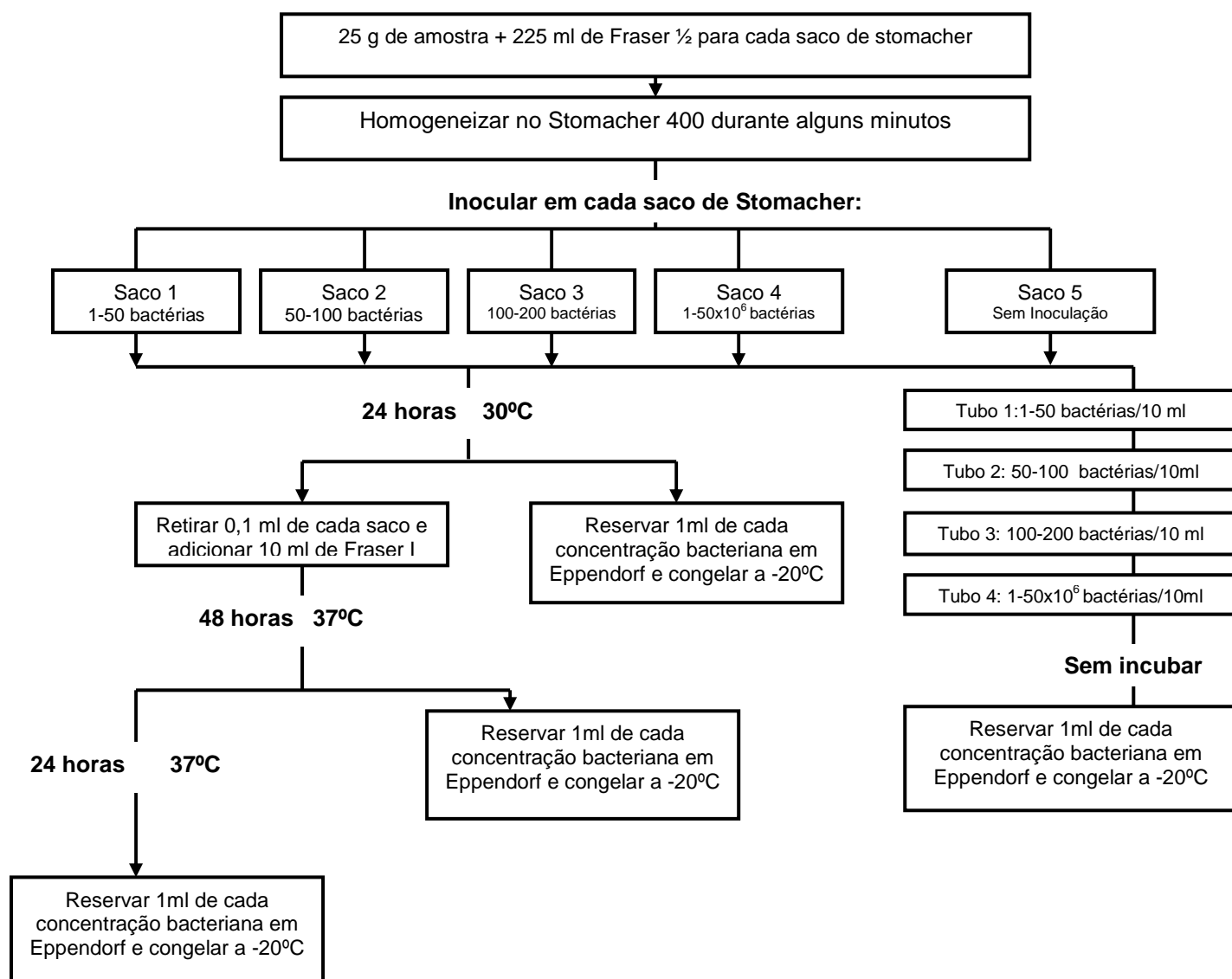


Figura 19: Protocolo de inoculações das amostras para determinação da sensibilidade da metodologia PCR.

9. Metodologia molecular baseada na reacção em cadeia da Polimerase – PCR para pesquisa de *Listeria monocytogenes* em 25g de amostra de peito de frango colhido em matadouro comercial

9.1. Preparação das amostras

A partir de 25g de carne de peito de frango colhida de forma asséptica, realizou-se um pré-enriquecimento em 225 ml de meio de Fraser 1/2 (Scharlau Chemie, Barcelona) durante 24 horas a 30°C após o qual se fez o enriquecimento em meio de

Fraser I que incubou durante 48 horas a 37°C. Após cada período de enriquecimento (Fraser ½ e Fraser I) reservou-se em duplicado 1 ml de suspensão em tubo Eppendorf que se colocou a -20°C para posterior extracção do DNA.

9.2. Extracção do DNA das amostras para PCR

Um mililitro de cada amostra foi centrifugado (Eppendorf – Centrifuge 5415 R) durante cinco minutos a 10,000g (10400 RPM), a 4°C. O sobrenadante foi eliminado e os “pellets” foram ressuspensos em 300 µl de resina Chelex 100 a 6% (Merck, Alemanha) em água, misturados no Vortex, colocados em banho de água a 100°C durante 8 minutos, misturados no vortex novamente e arrefecidos rapidamente no gelo até uma temperatura de aproximadamente 52°C. Finalmente foram centrifugados de novo durante cinco minutos a 10000 g a 4°C e reservou-se em novo tubo de Eppendorf 300 µl do sobrenadante que se congelou a -20°C para utilização posterior (adaptado de Rodríguez – Lázaro *et al.*, 2004).

9.3. Controlos da reacção

Para assegurar o procedimento analítico, em todas as reacções de PCR foram utilizados controlos positivos (DNA de *Listeria monocytogenes* 4a CECT 934 e extraído para este fim) e um controlo negativo (mqH₂O) para controlo do processo de extracção e amplificação.

9.4. Reacção da Polimerase em Cadeia – PCR

A reacção de PCR foi realizada num termociclador “standard” e a identificação dos produtos da reacção foi efectuada por electroforese em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídio. Os “primers” utilizados foram os que se reportam ao gene *prfA*, em que LIP1 e LIP2 são referentes aos nucleótidos 634 a 654 (5'-GATACAGAAACATCGGTTGGC) e 886 a 907 (5'-GTGTAACCTTGATGCCATCAGG) respectivamente, os quais dão origem a um produto de 274 pb (Simon, Gray & Cook, 1996; Talon *et al.*, 2007). O gene *prfA* está envolvido na regulação da síntese da listeriolisina (Holko, Urbanová, Kantiková, Pástorová & Kmet, 2002; Talon *et al.*, 2007). As reacções de PCR foram realizadas em tubos para PCR de 0,5 ml de parede fina (Eppendorf, Hamburg), usando um termociclador (PCR System 9700, Gene Amp, Applied Biosystems). A mistura utilizada tem na sua constituição 5 µl de DNA extraído das amostras e as concentrações finais de 2,5mM de MgCl₂, 150 µM de cada desoxinucleótido, 0,3 µM de cada primer (Invitrogen, Lisboa), 1µg/l de vBSA (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 1U de *Taq* DNA Polimerase (NZyTech, Lisboa). Como controlo

positivo foi utilizado DNA de *Listeria monocytogenes* 4 CECT 934. Os parâmetros dos ciclos foram, pré – incubação a 94°C durante 2 minutos, 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos (desnaturação), 55°C durante 30 segundos (annealing), 74°C durante 1 minuto (extensão) e a incubação final a 74°C durante 5 minutos. Os produtos da reacção foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio (Sigma, EUA) e visualizadas em transiluminador de UV (Image Master VDS, Pharmacia Biotech). Foi incluído conjuntamente com as amostras um marcador de DNA de 100 pb (Gehealthcare, USA). As imagens obtidas foram tratadas com o programa *Adobe Photoshop 7.0* para melhorar a definição.

10. Análise Estatística

Foi realizada uma análise descritiva dos resultados, utilizando para o efeito o programa SPSS Statistics 17.0 para Windows. O efeito do dia de abate, sistema de produção e origem/produtor sobre o parâmetro Enterobacteriaceae foi executado pelo ajuste de um modelo Univariate – ANOVA, com um grau de confiança de 95%.

Apresentação e Discussão de Resultados:

1. Avaliação da higiene das amostras de peito de frango

Embora o Regulamento 1441/2007 estabeleça que para a carne de frango, o critério de higiene do processo deva ser *Salmonella*, foi escolhido como parâmetro de avaliação de higiene do abate a contagem de Enterobacteriaceae por motivos de logística do laboratório. O Painel Científico dos Riscos Biológicos (Painel BIOHAZ) da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA) emitiu um parecer sobre Enterobacteriaceae como indicadores de *Salmonella* e de *Enterobacter sakazakii*. Concluiu não ser possível estabelecer uma correlação entre as Enterobacteriaceae e a *Salmonella* e que não existe uma correlação universal entre as Enterobacteriaceae e *Enterobacter sakazakii*.

Na Figura 20 estão representadas as contagens de Enterobacteriaceae em amostras de peito de frango recolhidas em três dias diferentes de abate/desmancha. Os valores médios foram de 3,50 log ufc/g, 3,27 log ufc/g e 3,51 log ufc/g respectivamente, e entre os quais não se verificaram diferenças significativas ($F=2,55$; Significância=0,09).

O valor médio de Enterobacteriaceae em todas as amostras de carne de peito de frango analisadas ($n=52$) foi de 3,4 log ufc/g, com um desvio padrão de 0,06.

Nos peitos de frango provenientes dos três tipos de produção, (Figura 21) as contagens de Enterobacteriaceae foram de 3,41 log ufc/g, 3,46 log ufc/g e 3,37 log ufc/g para a produção biológica ($n=16$), produção extensiva ($n=20$), produção intensiva ($n=16$) respectivamente, não se verificando qualquer diferença significativa entre elas ($F=0,27$; Significância=0,77).

As contagens médias de Enterobacteriaceae em carne de frangos provenientes de bandos e explorações avícolas diferentes estão representadas na Figura 22, verificando-se que existem diferenças significativas entre eles ($F=2,48$; Significância=0,016), sendo esta diferença ainda mais significativa entre os bandos A, D e N relativamente aos restantes.

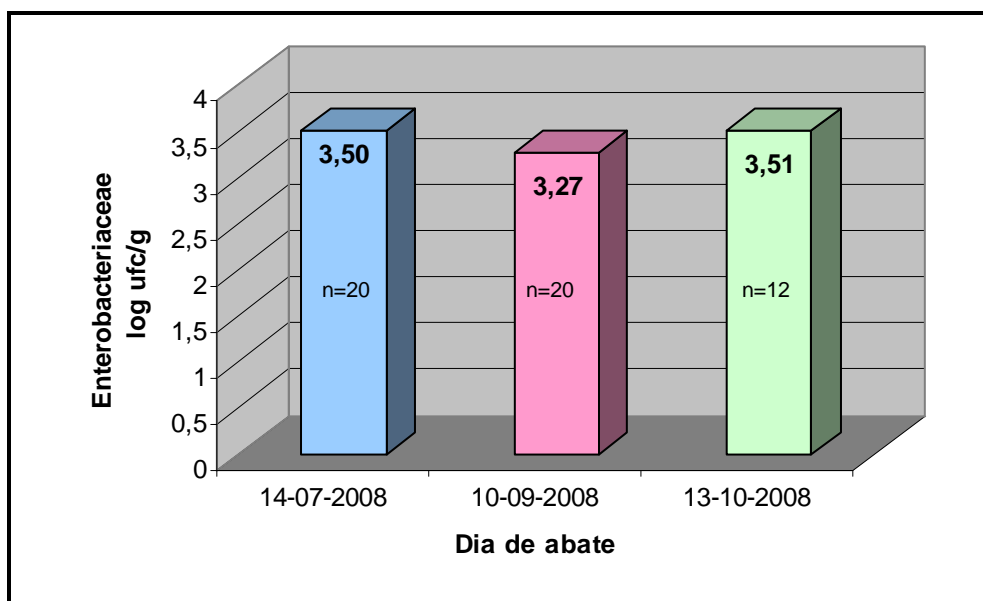


Figura 20: Contagens de Enterobacteriaceae (log ufc/g) em amostras de peito de frango recolhidas em diferentes dias de abate/desmancha.

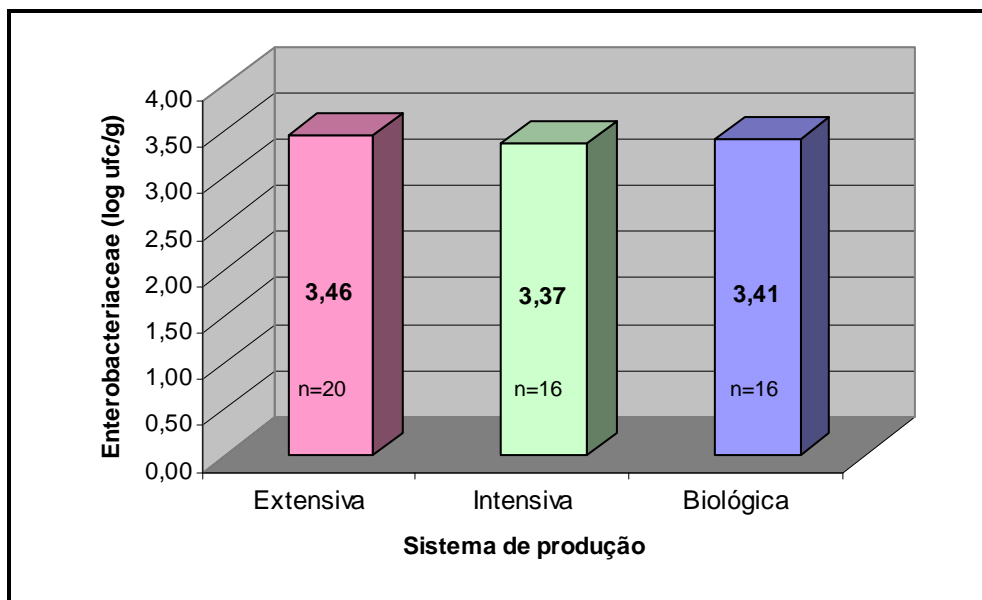


Figura 21: Contagens de Enterobacteriaceae (log ufc/g) em peitos de frango provenientes de três tipos de produção.

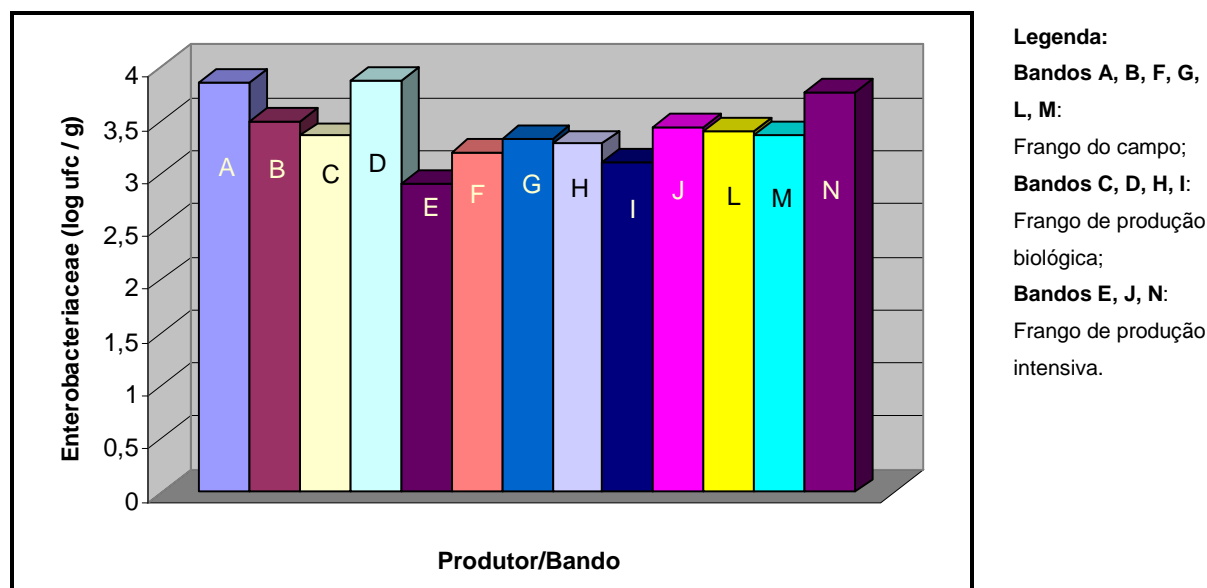


Figura 22: Contagens médias de Enterobacteriaceae (log ufc/g) por bando em peitos de frangos (n = 4 / bando), provenientes de diferentes bandos.

As aves quando chegam ao matadouro estão muito contaminadas com bactérias, muitas delas potencialmente patogênicas para o Homem, tais como *E. coli* e *Salmonella* spp (Göksoy *et al.*, 2004).

Da totalidade das amostras colhidas, apenas uma teve contagens de Enterobacteriaceae superiores a 4 log ufc/g, que corresponde ao valor de referência referido por Mossel (1995), como limite superior de boa qualidade higiénica.

Göksoy *et al.* (2004) observaram que o teor de Enterobacteriaceae foi de 3,81 log ufc/g e 3,91 log ufc/g após o arrefecimento em amostras de pele de carcaças de frango provenientes de dois matadouros diferentes. A legislação nacional e da UE não fixa teores máximos de concentrações de Enterobacteriaceae em carne de frango. No entanto os valores de coliformes fecais por grama de preparados de carne referidos na legislação francesa são iguais a 10^3 ufg/g .

O efeito dos diferentes dias de abate/desmancha no indicador de higiene de processo Enterobacteriaceae encontrado em peitos das carcaças de frango abatidas e desmanchadas não se verificou, visto não terem sido encontradas diferenças significativas. Por fim, pode-se inferir que as práticas do matadouro relacionadas com os procedimentos das linhas de abate se fazem de forma higiénica e efectiva relativamente à prevenção da contaminação fecal das carcaças, uma vez que as contagens de Enterobacteriaceae foram baixas em todos os dias de recolha. Além disso as condições de trabalho no matadouro cumpriam os requisitos legais

relativamente à temperatura da sala de desmancha (< 12°C) (Regulamento 853/2003), limitando a proliferação bacteriana na carne.

A primeira colheita de amostras no presente estudo foi efectuada no Verão, o que expôs os bandos nas explorações a temperaturas superiores. No segundo e terceiro dia de colheita as temperaturas foram inferiores relativamente ao primeiro ensaio, por já estarmos no final do Verão e início do Outono respectivamente. Segundo Cohen *et al.* (2007), nas estações do ano mais quentes, a flora microbiana dos bandos e consequentemente das carcaças aparece aumentada. No entanto, as alterações ambientais não contribuíram para variações significativas nas contagens de Enterobacteriaceae observadas nas amostras de peito de frango neste estudo, talvez porque no nosso país as amplitudes térmicas não são grandes, no final do Verão e o Outono de 2008 registaram-se temperaturas superiores às previstas e as condições de alojamento das aves permitirem maior controlo da temperatura. Também Mengert & Fehlhaber (1996) submeteram as aves a stress por calor adicional durante o transporte e verificaram que não teve influência no teor bacteriano endógeno.

Outro factor que poderia ter efeito na higiene da carne de frango obtida é o sistema de produção de frangos. No matadouro em que se efectuaram as colheitas, são abatidos frangos provenientes de explorações de produção intensiva, de produção extensiva e de produção biológica. As aves provenientes destes dois últimos sistemas são abatidas na mesma linha de abate e posteriormente evisceradas manualmente. Ao invés destas, os frangos do sistema intensivo são abatidos em linha de abate diferente e a evisceração feita de forma automática. Estas diferenças no abate e obtenção de carcaças que são usadas na desmancha, poderiam introduzir à partida diferentes valores de flora contaminante nas carcaças de diferentes origens. Os teores de Enterobacteriaceae no final do abate, podem em algumas situações aumentar devido à evisceração automática porque durante a mesma há maior probabilidade de rotura do tubo digestivo (Mead *et al.*, 1993; Abu-Rwaida *et al.*, 1994 citados por Göksoy *et al.*, 2004). Há poucos estudos focados na produção extensiva e biológica, onde as aves são expostas a múltiplas fontes de contaminação e a idade do abate é superior relativamente ao sistema intensivo (Esteban, Oporto, Aduriz, Juste & Hurtado, 2007). Têm sido tomadas medidas de biossegurança na produção de aves em sistema intensivo interior mas a prevenção da transmissão de *Salmonella* e de outras Enterobacteriaceae a partir do ambiente é mais difícil para regimes de produção no exterior (Esteban *et al.*, 2007). Num estudo de Bailey & Cosby (2005) citado por Esteban *et al.* (2007), a frequência de *Salmonella* em frangos criados em regime extensivo foi superior à do sistema de produção intensivo. Por outro lado,

Uyttendaele *et al.* (2005), citado também por Esteban *et al.*, (2007) estudaram a frequência de *Salmonella* em frangos na Bélgica e os resultados indicaram que esta era inferior no tipo de produção extensiva quando comparado com o sistema de produção intensivo, apontando para esta diferença a diminuição do stress das aves o que leva a uma diminuição da dispersão bacteriana pelas fezes. Além disso, a densidade populacional nestes sistemas (extensivo e biológico) é menor, o que diminui a transmissão fecal-oral.

Nos peitos desmanchados de carcaças de frango de diferentes sistemas produtivos não se verificaram diferenças significativas dos teores de Enterobacteriaceae, e isto pressupõe que os diferentes sistemas de produção não influenciaram a carga de Enterobacteriaceae dos bandos e que no matadouro ambas as linhas de abate têm desempenhos similares em termos de contaminação fecal.

Por fim, avaliou-se se diferentes produtores dão origem a diferenças significativas nas contagens de Enterobacteriaceae e de facto são observáveis diferenças significativas entre as diferentes explorações de origem. Pudémos então verificar que o manejo do frango até à chegada ao matadouro poderá de algum modo influenciar os teores de Enterobacteriaceae na carne de peito de frango.

O manejo, inclui aspectos relacionados com o estado sanitário dos animais, a densidade populacional do aviário, a limpeza e remoção das camas, a alimentação, o vazio sanitário, a lavagem e desinfecção dos camiões e caixas de transporte das aves vivas, o cumprimento do período de jejum, a diminuição do stress aquando da apanha e transporte, entre outras, que podem influenciar o estado higido das aves e assim fazer aumentar a excreção destes agentes pelas fezes. A contaminação de aves vivas com microrganismos potencialmente patogénicos começa com a colonização do tracto gastro-intestinal por estas bactérias, e é influenciada pelo estado vacinal dos animais, tratamentos anti-microbianos, e competição com a flora intestinal nativa (Mulder, 2008). No estudo de Mengert & Fehlhaber (1996), verificou-se que mesmo um transporte normal de aves aumenta a taxa de contaminação bacteriana em quase 50% e 10% dos animais transportados sofriam de bacteriémia induzida pelo stress. Pelo exposto verificou-se que o manejo das aves até à chegada ao matadouro tem consequências na sua contaminação, que por sua vez influencia a carga microbiana do produto final.

2. Otimização e validação da metodologia PCR. Limite de detecção

Na Tabela 9, Figura 23 e Figura 24 apresentam-se os resultados do ensaio de inoculação em matriz de frango para validação e determinação do limite de detecção

Sub Amostras	Identificação	Ensaio 1	
		Amostra A	Amostra B
		PCR	PCR
1	Fraser I; sem incubação; 1-50 bactérias/10 ml	N	N
2	Fraser I; sem incubação; 50-100 bactérias /10 ml	N	N
3	Fraser I; sem incubação; 100-200 bactérias /10 ml	N	N
4	Fraser I; sem incubação; 1-50 x 10 ⁶ bactérias /10 ml	N	N
5	Fraser I; sem incubação; sem inoculação	N	N
6	Fraser I; incubação 24h/30°C; 1-50 bactérias/25g	N	N
7	Fraser I; incubação 24h/30°C; 50-100 bactérias/25g	N	N
8	Fraser I; incubação 24h/30°C; 150 bactérias/25g	N	N
9	Fraser I; incubação 24h/30°C; 1-50 x 10 ⁶ bactérias/25g	P	P
10	Fraser I; incubação 24h/30°C; sem inoculação	N	N
11	Fraser II; incubação 48h/37°C; 1-50 bactérias/25g	P	P
12	Fraser II; incubação 48h/37°C; 50-100 bactérias/25g	P	P
13	Fraser II; incubação 48h/37°C; 100-200 bactérias/25g	P	P
14	Fraser II; incubação 48h/37°C; 1-50 x 10 ⁶ bactérias/25g	P	P
15	Fraser II; incubação 48h/37°C; sem inoculação	N	N

Tabela 9: Resultado das reacções de PCR realizadas em amostras recolhidas em diferentes etapas de enriquecimento para pesquisa de *Listeria monocytogenes* em peito de frango, inoculado com diferentes teores de *Listeria monocytogenes*.

Legenda:

N: Negativo para a presença de *Listeria monocytogenes*

P: Positivo para a presença de *Listeria monocytogenes*

da metodologia preconizada neste estudo. Nos tubos com 10 ml de suspensão de 25g de frango em 225 ml de Fraser ½ e inoculações de concentrações crescentes de *Listeria monocytogenes*, não incubados, não foi possível detectar a presença desta bactéria. Das sub-amostras inoculadas e incubadas, após a primeira fase de enriquecimento (Fraser ½, 30°C, 24 horas) apenas a amostra com concentração bacteriana igual a 25 x 10⁶ bactérias/25g (10⁶ bactérias/g) permitiu a detecção de uma banda característica (figura 23). Nas restantes sub-amostras (figura 24) não foi possível detectar a presença de bandas correspondentes a *Listeria monocytogenes* em 25g. Após a segunda fase de enriquecimento (Fraser I, 37°C, 48 horas), foi detectada a presença de *Listeria monocytogenes* em todas as sub-amostras inoculadas com as diferentes concentrações desta bactéria. As sub amostras 5, 10 e

15 (Tabela 9), que não foram inoculadas e serviram como controlo negativo, não originaram nenhuma banda de amplificação correspondente a DNA de *Listeria monocytogenes*.

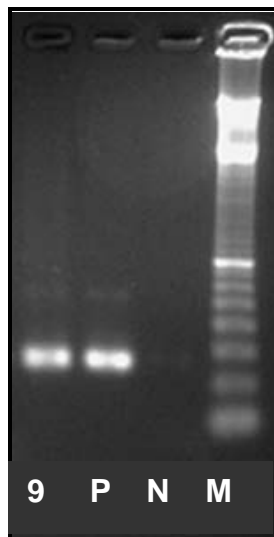


Figura 23: PCR das amostras de peitos de frango inoculadas, observando-se as bandas características de *Listeria monocytogenes*.

Legenda:

9: Fraser 1/2; incubação 24h/30°C; 25×10^6 bactérias/25g;

P: Controlo Positivo;

N: Controlo Negativo;

M: Marcador com 100 pb.



Figura 24: PCR das amostras de peitos de Frango inoculadas com concentrações crescentes de bactérias/g em meio Fraser ½ incubadas durante 24 horas a 30°C, a 37°C em meio de Fraser I após 48 horas, e zero horas de incubação correspondentes ao ensaio número um e onde se podem observar as bandas características de *Listeria monocytogenes* nas amostras 11, 12, 14.

Legenda:

1: Fraser I; sem incubação; 25 bactérias/10 ml; 2: Fraser I; sem incubação; 75 bactérias /10 ml; 3: Fraser I; sem incubação; 150 bactérias /10 ml; 5: Fraser I; sem incubação; sem inoculação 6: Fraser I; incubação 24h/30°C; 25 bactérias/25g; 7: Fraser I; incubação 24h/30°C; 75 bactérias/25g; 8: Fraser I; incubação 24h/30°C; 150 bactérias/25g; 10: Fraser I; incubação 24h/30°C; sem inoculação; 11: Fraser II; incubação 48h/37°C; 25 bactérias/25g; 12: Fraser II; incubação 48h/37°C; 75 bactérias/25g; 13: Fraser II; incubação 48h/37°C; 150 bactérias/25g; 15: Fraser II; incubação 48h/37°C; sem inoculação; P: Controlo Positivo; N:Controlo Negativo; M:Marcador de 100 pb.

A detecção de *Listeria monocytogenes*, através de métodos moleculares em alimentos pode ser condicionada por diversos factores os quais podem comprometer os resultados, é importante elaborar um estudo prévio da sensibilidade do protocolo de PCR clássico adoptado para este trabalho experimental. A avaliação da sensibilidade desta metodologia demonstra que sem enriquecimento (Tabela 8), mesmo concentrações tão elevadas como 10^3 bactérias/ml não são passíveis de serem detectadas de forma directa, isto é, sem enriquecimento, resultados que estão de acordo com estudos anteriores. (Fitter *et al.*, 1992; Barocci *et al.*, 2008). Duffy *et al.*, (1999, citado por Levin, 2003) após incubação durante 18-24 horas tiveram como limite de detecção 1×10^4 bactérias/ml em carne de frango. Com esta metodologia é possível detectar quantidades tão pequenas como 1 bactéria/g, após enriquecimento em Fraser I das amostras, embora as comparações e extrapolações devam ser acauteladas uma vez que geralmente há diferenças na extracção, reacção e matriz alimentar entre estudos diferentes e que influenciam os resultados obtidos (Liu, 2008).

Podemos verificar que o PCR é um método rápido e eficiente na detecção de *Listeria monocytogenes*, mas cuja aplicação correcta a amostras de alimentos está limitada, por estes terem geralmente baixas concentrações de agentes patogénicos, populações bacterianas heterogéneas e elevados volumes de matriz de alimento que contêm substâncias que podem inibir alguns dos compostos da reacção de PCR (Murphy *et al.*, 2007). A ausência de incubação leva a que tenhamos maior quantidade de potenciais inibidores da reacção provenientes da matriz do alimento (Liu, 2008). A metodologia acoplada a PCR utilizada foi associada a pré – enriquecimento da amostra a qual parece ser a opção certa para a identificação de *Listeria monocytogenes*, pois permite a detecção de níveis relativamente baixos de bactérias viáveis (O'Grady *et al.*, 2008).

A utilização de um controlo positivo interno, permite avaliar todas as possíveis falhas internas do método PCR devido à presença de substâncias da matriz do alimento. Assim assegura-se que o extracto de DNA pode ser passível de sofrer amplificação e que não existe na matriz do alimento qualquer composto que possa

inibir a amplificação do DNA. Os resultados negativos de PCR devem-se de facto a ausência de DNA e não a falsos negativos (Murphy *et al.*, 2007; Amagliani *et al.*, 2007).

3. Avaliação da segurança de amostras de peitos de frango: Pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes*

Das cinquenta e duas amostras de peito de frango testadas (Tabela10), todas deram resultados negativos pela metodologia PCR relativamente à presença de *Listeria monocytogenes*, cujo limite de detecção foi previamente estabelecido, o que significa que em todas as amostras a concentração inicial de *Listeria monocytogenes*, era inferior a 1 bactéria/g.

As contagens de *Listeria monocytogenes* pela metodologia clássica descrita em 4 foram inferiores a 10 ufc em 25g para todas as amostras testadas.

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* em 25g pela metodologia clássica resultou em dez amostras positivas no primeiro ensaio (n=20), uma amostra positiva no segundo ensaio (n=20) e zero amostras positivas no terceiro ensaio (n=12) (Tabela 10).

No primeiro ensaio submetemos aos testes bioquímicos API Listeria, as colónias suspeitas que cresceram no meio ALOA e posteriormente repicadas para meio TSA. Paralelamente foi feita a identificação molecular por PCR destas mesmas colónias. Obtivemos por ambos os métodos, a confirmação da presença de *Listeria monocytogenes* em 25g de amostra.

As amostras de frango das duas etapas de enriquecimento, em meio líquido também foram testadas por PCR e na sua totalidade os resultados foram negativos quanto à presença de *Listeria monocytogenes*, o que significa que os valores de contaminação por *Listeria monocytogenes* da carne de peito de frango são inferiores a 25bactérias/25g, visto a sensibilidade do método ser de 1 bactéria/g.

Face aos resultados obtidos pelo método clássico, parece ter havido no primeiro ensaio contaminações cruzadas entre carcaças. Nos ensaios posteriores, pela mesma metodologia, os valores foram baixos ou nulos, razão pela qual parece-nos não haver população residente de *Listeria monocytogenes* neste matadouro, nem na sala de desmancha (onde se incluem todos os utensílios e equipamentos que contactam com as carcaças de frangos antes e depois do abate e desmancha), pois se assim fosse teríamos um isolamento consistente de *Listeria monocytogenes* nos restantes ensaios, o que não ocorreu (Lawrence & Gilmour, 1994), nem na carne, nem nos materiais que com ela contactarem (cones e caixas de transporte).

Bando	Amostra	contagem (log ufc/g)	Aloa (FI/2) ²	Aloa (FI) ³	TSA ⁴	Gram	Oxidase	Catalase	API Listeria	PCR
ENSAIO I / 14 de Julho de 2008										
Bando A Frango de regime extensivo	P93	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P94	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P95	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P96	< 1	S	S	S	+ / Bast.	N	P	L.m.	N ¹
Bando B Frango de regime extensivo	P97	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P98	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P99	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P100	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
Bando C Frango de produção biológica	P101	< 1	N	S	S	+ / Bast.	N	P	L.m.	N ¹
	P102	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P103	< 1	S	S	S	+ / Bast.	N	P	L.m.	N ¹
	P104	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
Bando D Frango de produção biológica	P105	< 1	S	S	+	+ / Bast.	N	P	L.m.	N ¹
	P106	< 1	S	N	+	+ / Bast.	N	P	L.m.	N ¹
	P107	< 1	S	S	+	+ / Bast.	N	P	L.m.	N ¹
	P108	< 1	S	S	+	+ / Bast.	N	P	L.m.	N ¹
Bando E Frango de regime intensivo	P109	< 1	S	S	+	+ / Bast.	N	P	L.m.	N ¹
	P110	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P111	< 1	N	S	+	+ / Bast.	N	P	L.m.	N ¹
	P112	< 1	N	S	+	+ / Bast.	N	P	L.m.	N ¹
Cone		< 1	< 1	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
ENSAIO II / 10 de Setembro de 2008										
Bando F Frango de regime extensivo	P113	< 1	S	N	NR	NF	NR	NR	N	N
	P114	< 1	S	S	P	+ / Bast.	N	P	N	N
	P115	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P116	< 1	S	S	P	+ / Bast.	N	P	N	N
Bando G Frango de regime extensivo	P117	< 1	N	N	NR	NR	NR	N	N	N
	P118	< 1	N	N	NR	NR	NR	N	N	N
	P119	< 1	N	N	NR	NR	NR	N	N	N
	P120	< 1	N	N	NR	NR	NR	N	N	N
Bando H Frango de produção biológica	P121	< 1	N	S	P	+ / Bast.	N	P	N	N
	P122	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P123	< 1	S	S	P	+ / Bast.	N	P	N	N
	P124	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
Bando I Frango de produção biológica	P125	< 1	S	S	S	+ / Bast.	N	P	L.m.	N
	P126	< 1	S	N	S	+ / Bast.	N	P	N	N
	P127	< 1	S	S	S	+ / Bast.	N	P	N	N
	P128	< 1	S	S	S	+ / Bast.	N	P	N	N
Bando J Frango de regime intensivo	P129	< 1	S	S	S	+ / Bast.	N	P	N	N
	P130	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P131	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P132	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
ENSAIO III / 13 de Outubro de 2008										
Bando J Frango de regime extensivo	P133	< 1	S	S	+	+ / Bast.	N	N	N	N
	P134	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P135	< 1	N	P	P	+ / Bast.	N	N	N	N
	P136	< 1	N	P	P	+ / Bast.	N	N	N	N
Bando L Frango de regime extensivo	P137	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P138	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P139	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P140	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
Bando M Frango de regime intensivo	P141	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
	P142	< 1	S	S	S	+ / Bast.	N	N	N	N
	P143	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
Superfície da bancada	P144	< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
		< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N
Caixa		< 1	N	N	NR	NR	NR	NR	NR	N

Tabela 10: Resultados da contagem e pesquisa de *Listeria monocytogenes* em carne de peitos de frango.

Legenda:**Bast.:** Bastonetes**N:** Ausência de suspeita de existência de *Listeria monocytogenes***NR1:** Provas não realizadas por inexistência de colônias suspeitas nas placas de ALOA**P:** Presença de *Listeria monocytogenes***S:** Suspeita de presença *Listeria monocytogenes***L.m.:** Resultado positivo para *Listeria monocytogenes* através do teste API Listeria¹: Resultado de PCR negativo a partir dos meios Fraser ½ e Fraser I e positivo a partir de colônias suspeitas, retiradas de placas de TSA.²: Resultados correspondentes ao aparecimento de colônias características de *Listeria monocytogenes* em placas de ALOA por sementeira a partir do meio Frase I/2 (Half Fraser).³: Resultados correspondentes ao aparecimento de colônias características de *Listeria monocytogenes* em placas de ALOA por sementeira a partir do meio Frase I (Fraser One).⁴: Colônias características presentes em placas de TSA que cresceram a partir de colônias características repicadas das placas de ALOA

Estes resultados (21%) são no entanto inferiores aos descritos por alguns autores. Lawrence & Guilmour (1994) obtiveram resultados positivos pela técnica de PCR-Multiplex quanto à presença de *Listeria monocytogenes* em 10 das 12 amostras (83%) de carne de peito removidas manualmente da carcaça. Vitas *et al.* (2003) detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 57 das 158 amostras (36,1%) de carne de frango colhidas em pequenas unidades de processamento de Navarra (Espanha) através da metodologia clássica. Barbalho *et al.*, (2005) avaliaram a presença de *Listeria monocytogenes* num matadouro do Brasil, e só isolaram este agente em 14,3% das amostras, e apenas em carcaças embaladas prontas a seguirem o circuito de distribuição, utilizando para isso um teste de susceptibilidade ao bacteriófago A511. Mena *et al.*, (2005) obtiveram uma incidência de 60% em amostras de carne de frango crua recolhida nos produtores e retalhistas, em Portugal, testadas através da metodologia mini-VIDAS usando anticorpos específicos para *Listeria monocytogenes* (Tabela 11).

Ensaio	Método Clássico	Pesquisa por PCR
	Positivos (%)	Positivos (%)
Ensaio I ¹ (n=20)	50%	0
Ensaio II ¹ (n=20)	5%	0
Ensaio III ¹ (n=12)	0%	0
Total dos ensaios (n=52)	21%	0
Lawrence & Guilmour	83%	
Barbalho <i>et al.</i>	14%	
Mena <i>et al.</i>	60%	
Vitas <i>et al.</i>	36,1%	

Tabela 11: Análise comparativa da frequência de *Listeria monocytogenes* em carne de frango, em diferentes estudos.

A identificação por PCR de colónias suspeitas retiradas da placa de TSA e ressuspensas, permite poupar algum tempo face ao método convencional de identificação além de permitir que estas colónias possam ser conservadas por longos períodos de tempo a -20°C ou -80°C para posteriores avaliações e estudos (Lawrence & Gilmour, 1994), o que é vantajoso relativamente à metodologia clássica. Além disso, as provas bioquímicas do API Listeria permitem alguma ambiguidade nos resultados, tendo sido algumas estirpes de *Listeria monocytogenes* confundidas com *Listeria innocua* por resultados duvidosos relativamente ao teste DIM (Differentiation /Innocua /Monocytogenes), baseado na presença ou ausência de arilamidase da galeria API Listeria, o que já foi documentado por diversos autores (Rebuffo *et al.*, 2005). Neste trabalho sentimos por vezes alguma dificuldade na interpretação dos resultados das cores do teste API Listeria pelo facto de a fronteira de cores ser em alguns casos muito ténue. Seguindo o protocolo em que se extrai o DNA de colónias isoladas em placa, poderemos evitar as substâncias que podem inibir a reacção de PCR e que estão presentes na matriz do alimento e nos meios de enriquecimento (Gouws & Liedemann, 2005).

Os resultados das amostras testadas por PCR indicam um risco de listeriose associado baixo, uma vez que são inferiores à dose vulgarmente aceite como infectante, menor que 100 células bacterianas para indivíduos susceptíveis (OIE, 2005; IFT, 2004; FDA, 2002) ou valores superiores para adultos saudáveis (OIE, 2005), facto que é corroborado pela elevada frequência e distribuição deste microrganismo em alimentos e número reduzido de casos de listeriose. Contudo foi já referido nos EUA casos de listeriose associada a alimentos com teores de *Listeria monocytogenes* inferiores a 0,3 ufc/g (Vitas, Aguado & Garcia-Jalon, 2004).

Os valores baixos de contaminação por *Listeria monocytogenes*, com a totalidade das amostras de carne de frango a apresentarem valores inferiores a 1 bactéria/g, sugeridos por este estudo são indicativos de que neste operador económico se observam boas práticas de higiene e aplicação do plano de HACCP.

4. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em amostras de equipamento da sala de desmancha

A colheita de amostras de superfície de equipamento da sala de desmancha, foi realizada no primeiro ensaio em cone de carrossel de desmancha, que revelou teores de *Listeria monocytogenes* inferiores a 1 ufc/cm². No terceiro e último ensaio foram colhidas amostras de superfície de uma bancada de desmancha e do fundo de uma caixa de transporte de carcaças, e também em ambos os teores de *Listeria monocytogenes* inferiores a 1 ufc/cm². Segundo diversos autores (Cox *et al.*, 1997; Göksoy *et al.*, 2004; López *et al.*, 2008), a contaminação das carcaças por *Listeria monocytogenes*, ocorre durante o processo de abate e desmancha de frangos, consequência de uma maior manipulação. As amostras de peito de frango testadas no presente estudo foram obtidas, tal como referido anteriormente, por desmancha manual das carcaças, havendo por isso contacto íntimo com o equipamento.

Embora a legislação actual estabeleça que a colheita de superfícies deva ser feita em superfícies regulares, também foi testada a superfície do cone de desmancha, pois a rugosidade da superfície pode favorecer a sua colonização por bactérias patogénicas, nomeadamente *Listeria monocytogenes*. As estruturas analisadas que contactam com as carcaças durante a desmancha e o transporte das mesmas, estavam isentas de *Listeria monocytogenes*, corroborando os resultados obtidos para as amostras de peito de frango. No entanto, as amostras colhidas (n=3) não são estatisticamente significativas e por isso estes resultados são meramente indicativos.

Conclusões

1. A metodologia baseada em PCR descrita neste trabalho, requer apenas 72 horas até obtenção de resultados o que é significativamente menor, comparativamente com o método “standard” baseado na ISO, tem custos relativamente mais baixos e permite testar um grande número de amostras em simultâneo. O limite de detecção da metodologia acoplada a PCR utilizada no presente trabalho tem uma sensibilidade de 1 bactéria/g após enriquecimento em Fraser I.
2. O teor médio de Enterobacteriaceae em todas as amostras de carne de peito de frango analisadas (n=52) foi de 3,4 log ufc/g, havendo por isso boas condições higiosanitárias de todo o processo de abate e desmancha de carcaças. O sistema de produção e o dia de colheita não influenciam significativamente os teores de Enterobacteriaceae, mas ao invés destes, explorações avícolas de origem diferentes originam contagens de Enterobacteriaceae significativamente diferentes.
3. A frequência de isolamento de *Listeria monocytogenes* a partir de carne de frango foi de 21%. No entanto nenhuma destas amostras deram resultados positivos pela metodologia de PCR aplicada aos meios líquidos de enriquecimento.
4. As amostras de peitos de frango (n=52) avaliadas neste estudo pelo método de PCR, que se apresentaram negativas, têm teores de *Listeria monocytogenes* inferiores a 1 bactéria/g, e são por isso consideradas seguras para os consumidores. No entanto, sabendo que são produtos refrigerados durante períodos consideráveis de tempo o que permite desenvolvimento desta bactéria, é fundamental informar os consumidores, em particular os considerados de risco, que devem em ambiente doméstico evitar as contaminações cruzadas entre os diferentes géneros alimentícios e cozinhar bem este alimento.
5. Quanto à garantia de ausência desta bactéria em carne de frango, não é a verificação da ausência de *Listeria monocytogenes* através desta metodologia de PCR utilizada ou outra metodologia que permite atingir esse objectivo mas sim a aplicação de medidas proactivas ao nível da produção, abate, desmancha, distribuição e consumo.

Perpectivas futuras

As diversas metodologias baseadas na biologia molecular, vieram trazer um contributo enorme à segurança alimentar, tornando a pesquisa de agentes de infecções de origem alimentar mais eficiente e mais célere. No que concerne à metodologia baseada em PCR, sabemos existirem diversas substâncias que a podem inibir, além de poder ser influenciada pelo método de extracção de DNA e ainda pelo tipo e duração do processo de enriquecimento, o que denota desde logo a necessidade de um estudo de cada tipo de alimento e da adaptação da metodologia de forma específica a cada matriz de alimento, para deste modo haver processos “standard” para cada binómio agente patogénico/matriz de alimento, e assim podermos ter resultados mais comparáveis e mais fiáveis.

Sabemos hoje, que embora *Listeria monocytogenes* seja considerada patogénica para o Homem, existem na verdade dentro desta espécie, estirpes virulentas e estirpes avirulentas, pelo que se impõe uma pesquisa laboriosa em vários matadouros e outros complexos onde se manipule carne de frango e se faça PCR ou outra metodologia moléculas dirigidas para a diferenciação da virulência das estirpes e em simultâneo uma caracterização das estirpes existentes/residentes nestas estruturas (matadouros e salas de desmancha), mas que necessita no entanto de mais pesquisas moléculares para se obter uma base genética mais clara da virulência e patogenia desta bactéria. López *et al.*(2008) demonstraram haver variabilidade de virulência associada a genótipos diferentes e que ainda existem sub-tipos que podem persistir durante anos nos locais de processamento de alimentos.

Para além do referido, dever-se-ia fazer um estudo nacional da prevalência desta bactéria nos bandos, uma vez que as aves podem carregar esta bactéria no seu intestino o que permite o acesso deste agente patogénico às linhas de abate e desmancha, para poder ser programado o abate dos bandos portadores para o fim e ainda possibilitar o estudo de medidas de controlo efectivo desta bactéria ao nível dos bandos.

Com as informações recolhidas pelas propostas anteriores, poderia ser criada então uma base de dados referente a *Listeria monocytogenes*/ Listeriose, em parceria com instituições nacionais como laboratórios de referência e hospitais, resultando em sistema de alerta rápido desta doença, estudo da prevalência em animais e humanos, análise de risco e elaboração de código de boas práticas para evitar por manipulação doméstica de alimentos os casos de listeriose e as contaminações cruzadas.

Bibliografia:

- Alvarado, C.** (2006). Chapter 33 : Poultry Processing Quality. *In* : Handbook of Food Science. Technology and Engineering– Vol. 1, Ed. Hui. Y.Taylor & Francis. USA. pp. 33-1 – 33-12.
- Amagliani, G.**, Giammarini, C., Omiccioli, E., Brandi, G. & Magnani, M. (2007). Detection of *Listeria monocytogenes* using comercial PCR kit and different DNA extraction methods. Food Control, 18: 1137-1142.
- Anónimo**, (2007a); Microbiologia Clínica; LABACVET.
- Anónimo b**, SOP 13: esiRNA Silencing Resource – preparation and application; [http://www.rnai.ngfn.de/dateien/RZPD_SOP13\(2\).pdf](http://www.rnai.ngfn.de/dateien/RZPD_SOP13(2).pdf). Consultado em 10 de Janeiro de 2008.
- Anónimo**, (2008), Real Time PCR. <http://www.slideshare.net/labimuno/realtime-presentation/>. Consultado em 10 de Janeiro de 2008.
- Anónimo**, (2007d). *Listeria*: The story so far. Food Engineering & Ingredients. October. Special Issue:6-10. www.labint-online.com/index.php?id=2071
- Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU countries [AVEC]**. (2008). Annual Report. http://avec-poultry.synkron.com/graphics/archive/Annual_reports/Annual%20report%202008/AVEC%20%2008%20%2805-09%29.pdf
- Barbalho, T.**, Almeida, P., Almeida, R. & Hofer, E., (2005). Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for confirmation of suspected colonies. Food Control, 16: 211 – 216.
- Barocci S.**, Calza, L., Blasi, G., Briscolini, S., De Curtis, M., Palombo, B., Cucco, L., Postacchini, M., Matteo Sabbatini, Graziosi, T., Nardi, S. & Pezzotti, G. (2007). Evaluation of a rapid molecular method for detection of *Listeria monocytogenes* directly from enrichment broth media. Food Control, 8: 750-756.
- Berrang, M.**; Lyon, C., Smith, D. & Northcutt, J. (2000). Incidence of *Listeria monocytogenes* on Pre-scald and Post-Chill Chicken. Journal of Applied Poultry Res, 9:546-550.
- Bierne, H. & Cossart, P.** (2007). *Listeria monocytogenes* Surface Proteins: from Genome Predictions to Function. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 71 (2): 377–397.
- Brown, T.**, (2006). Gene Cloning and DNA Analysis. 5th Edition. Blackwell Publishing, UK.

- Buhr, R. J., Berrang, E., Cason, A. & Bourassa V. (2005).** Recovery of Bacteria from Broiler Carcass Respiratory Tracts Before and After Immersion Scalding. *Poultry Science*. 84:1769–1773.
- Carson, A., Hinton, A., Jr. & Buhr, R. (2004).** Impact of Feathers and Feather Follicles on Broiler Carcass Bacteria. *Poultry Science*, 83:1452–1455.
- Chambel, L., Sol, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Zilhão, I., Barata, B., Jordan, S., Perni, S., Shama, G., Adrião, A., Faleiro, L., Requena, T., Peláez, C., Andrew, P. & Tenreiro, R. (2007).** Occurrence and persistence of *Listeria spp.* in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial – temporal mapping along production cycle. *International Journal of Food Microbiology*, 116: 52-63.
- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M. & Boor, K., (2008).** Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, 16,8:388-396.
- Cohen, N., Ennaji, H., Bouchrif, B., Hassar, M. & Karib, H. (2007).** Comparative Study of Microbiological Quality of Raw Poultry Meat at Various Seasons and for Different Slaughtering Process in Casablanca (Marocco). *J. Appl. Poult. Res.* 16: 502 – 508.
- Cossart P. (2007).** Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes and Infections* 9:1143-1146.
- Cox, N.A., Bailey, J.S. & Berrang, M.E. (1997).** The Presence of *Listeria monocytogenes* in the Integrated Poultry industry. *J. Appl. Poultry Res.* 6:116 – 119.
- Cox, N.A., Russel, S.M. & Bailey, J.S. (1998).** The microbiology of stored poultry. *In: The microbiology of meat and poultry*, Ed. Davies A. & Board R. Blackie Academic & Professional, UK. Pp. 267-287.
- Davies, A. & Board, R. (1998).** The Microbiology of Meat and Poultry. 1st Edition. Blackie Academic & Professional. UK.
- Decisão da Comissão 2008/426/CE** de 28 de Abril de 2008 que altera a Decisão 2002/253/CE que estabelece definições de casos para a notificação de doenças transmissíveis à rede comunitária ao abrigo da Decisão n.º 2119/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho.
- Decreto-Lei nº 28/96 de 2 de Abril.** Transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 93/119/CE, do Conselho, de 22 de Dezembro, relativa à protecção dos animais no abate e ou occisão.
- Denny, J. & McLauchlin, J., (2008).** Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe – na opportunity for improved european surveillance – Jan-Mar 2008. *Eurosurveillance*; vol. 13:1-3.
<http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V13N13/art8082.pdf>
- Doyle, M. & Erickson, M. (2006).** Reducing the Carriage of Foodborne Pathogens in Livestock and Poultry. *Poultry Science*. 85:960–973.

Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J. & Cossart, P., (2004). Molecular Determinantes of *Listeria monocytogenes* Virulence. Annu. Ver. Microbiol. 58:587 - 610.

European Food Safety Authority [EFSA]. (2004). Welfare Aspects of Animal Stunning and Killing Methods, Scientific Report of the Scientific Panel for Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare aspects of animal stunning and killing methods.

European Food Safety Authority [EFSA]. (2007a). Information on specific zoonoses – *Listeria*. European Food Safety Authority Journal. 130:149-352.

European Food Safety Authority [EFSA] (2007b). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Outbreaks in the European Union in 2006.

European Food Safety Authority [EFSA]. (2007c). Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness - Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards.
http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178671312912.htm

European Food Safety Authority [EFSA]. (2008). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *The EFSA Journal*. 765, 1-87.
http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178680093176.htm

Esteban, J., Oporto, B., Aduriz, G., Juste, R. & Hurtado, A., (2007). A survey of food – borne pathogens in free – range poultry farms. *International Journal of Food Microbiology*. 123:177-183.

Franciosa, G., Pourshaban, M., Gianfranceschi, M. & Aureli, P., (1998). Genetic typing of human and food isolates of *Listeria monocytogenes* from episodes of listerioses. *European Journal Of Epidemiology*. 14: 205-210.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization [FAO/WHO]. (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary. Microbiological risk assessment series: no. 4.

Fraqueza, M.J., Ferreira, M.C. & Barreto, A.S. (2006a). *Listeria monocytogenes* in turkey meat under modified atmosphere packaging with gas mixtures of argon or carbon monoxide. *Revista Portuguesa de Zootecnia*. 13 (1): 19-35.

Fraqueza, M.J., (2006b), Estudo das características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais de carne de peru embalada em atmosfera modificada. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

Food and Drug Administration [FDA], (1992); Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook: *Listeria monocytogenes*.
<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap6.html>

- Gaillard, L.,** Berche, P., Frechel, C., Gouin, E. & Cossart, P., (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigen from Gram – positive cocci. *Cell*. 65: 1127-1141.
- Göhmann, S.,** Leimester-Wächter, M., Schlitz, E., Goebel, W. & Charabarty, T., (1990). Characterization of a *Listeria monocytogenes* specific protein capable of inducing delayed hypersensitivity in *Listeria* –immune mice. *Molecular Microbiology*. 4: 1091-1099.
- Göksoy E.,** Kirkan S. & Kök F., (2004). Microbiological Quality of Broiler Carcasses During Processing in Two Slaughterhouses in Turkey. *Poultry Science* 83:1427–1432.
- Gouws, P. & Liedemann, I.,** (2005). Detection of *L. monocytogenes* in Food Products, *Food Technology and Biotechnology*. 43(2): 201-201.
- Gabinete de Planeamento e Políticas [GPP].** (2008). **Anuário Pecuário 2006-2007.** Edição Castel - Publicações e Edições, SA. Lisboa. Portugal.
- Health Protection Agency [HPA],** (2007). Identification of *Enterobacteriaceae*. National Standard Method BSOP. ID 16. Issue 2. UK
<http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/bsopid/pdf/bsopid16.pdf>
- Hagens S.,** (2008). Chief Scientific Officer, EBI Food Safety, looks at the latest developments of the bacterium *Listeria monocytogenes* and the natural technology that can destroy it. <http://www.labint-online.com/index.php?id=2259>
- Herenda, D. & Franco, D.** (1996). *Poultry diseases and meat hygiene: a color atlas*. 1st Edition. Iowa State University Press. Iowa.
- Hinton, A.,** Buhr, R. & Ingram K. (2000). Physical, Chemical, and Microbiological Changes in the Crop of Broiler Chickens Subjected to Incremental Feed Withdrawal *Poultry Science*, 79:212–218.
- Hubbert, W.,** Hagstad, H., Spangler, E., Hinton, M. & Hughes, K. (1996). *Food Safety and Quality Assurance: foods of animal origin*. 2nd Edition. Iowa State University Press. Iowa.
- Holko I.,** Urbanová, J., Kantiková, M., Pástorová, K. & Kmet, V. (2002). PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Milk Products and Differentiation of Suspect Isolates. *Acta Vet. Brno*, 71: 125-131.
- International Standard ISO 11290-1:1996.** (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method. Switzerland.
- International Standard ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004.** (2004). Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. Switzerland.
- International Standard ISO 11290-2:1996.** (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method. Switzerland.

- International Standard ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004.** (2004). Modification of the enumeration media. Switzerland.
- International Standard ISO 16140:2003.** (2003). Defines the general principle and the technical protocol for the validation of alternative methods in the field of microbiological analysis of food, animal feeding stuffs and environmental and veterinary samples for the validation of alternative methods which can be used in particular in the framework of the official control, and the international acceptance of the results obtained by the alternative method. Switzerland.
- International Standard ISO 18593: 2004.** (2004). Specifies horizontal methods for sampling techniques using contact plates or swabs on surfaces in the food industry environment (and food processing plants), with a view of detecting or enumerating viable microorganisms. Switzerland.
- International Standard ISO 21528 – 2:2004.** (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 2: Colony-count method. Switzerland.
- Instituto Nacional de Estatística [INE],** (2007); População residente (N.º) por Local de residência, Sexo e Grupo etário (por ciclos de vida).
http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000611&selTab=tab0
- Institute of Food Technologists [IFT].** (2004). Bacteria Associated with Foodborne Diseases. A Scientific Status Summary of the Institute of Food Technologists. Chicago, Ill.
<http://members.ift.org/NR/rdonlyres/3DEA7A91-DF48-42CE-B195-06B01C14E273/0/bacteria.pdf>.
- Instituto Nacional de Estatística [INE],** (2008). Boletim Mensal da Agricultura, Pescas e Agro-indústria – Janeiro e Outubro.
http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=32478703&PUBLICACOESmodo=2.
- Instituto Nacional de Estatística [INE],** (2006). Boletim Mensal da Agricultura, Pescas e Agro-indústria – Junho de 2006. www.ine.pt.
- Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge [INSA],** (2008). Custos e implicações das falhas na Higiene e Segurança Alimentar.
- Jersek, B., Majstorovic, T., Klun, N. & Mozina, S.** (2005). Impact of enrichment medium on PCR – based detection of *Listeria monocytogenes*. Acta Agriculturae Slovenica, 85-1:15-23.
- Lambooi, E., Reimert, H., Van de Vis, J. & Gerritzen, M.** (2008). Head – to – Cloaca Stunnet of Broilers. Poultry Science. 87: 2160-2165.
- Lawrence, L. & Gilmour, A.** (1994). Incidence of *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* in a Poultry Processing Environment and in Poultry Products and Their Rapid Confirmation by Multiplex PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60,12: 4600-4604.

- Leclercq, A.** (2004). Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono and ALOA solid media. *Journal of Microbiological Methods*, 57: 252-258.
- Levin, R.** (2003). Application of the Polymerase Chain Reaction for Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods; A Review of Methodology. *Food Biotechnology*, 17, 2: 99-116.
- Lima, M.**, (2008a). Editorial. Aves e Ovos, Setembro/Outubro: 31-33.
- Lima, M.**, (2008b). Perspectivas da Fileira Avícola. Aves e Ovos, Maio/Junho: 3.
- Lima, M.**, (2008c). Evolução da Balança de Pagamentos nos Sectores da Carne de Aves e dos Ovos. Observatório dos mercados agrícolas e das importações agro – alimentares. <http://www.observatorioagricola.pt/rubricas/BalançaAvesOvos4.pdf>
- Lin, Y. & Chou, C.** (2004). Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses. *Food Microbiology*, 21: 605 – 610.
- Liu, D.** (2008). Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification – Review. *Food Microbiology*, 122: 229 – 242.
- Liu, D.**, Lawrence, M., Austin, F. & Ainsworth, A. (2007). A Multiplex PCR for Species- and Virulence-specific Determination of *Listeria monocytogenes*: A Multiplex PCR for Species- and Virulence-specific Determination of *Listeria monocytogenes* - (Peer Reviewed Journal). *Journal of Microbiological Methods*. 71(2):133-140.
- Liu, D.**; Ainsworth A., Frank, A., Austin, F. & Lawrence, M. (2004). Use of PCR primers derived from putative transcriptional regulator gene for species – specific determination of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 91: 297-304.
- Liu, D.**; Ainsworth, F., Austin, F. & Lawrence, M. (2003). Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. *Journal of Medical Microbiology*, 52:1065-1070.
- López, V.**, Suárez, M., Chico-Calero, I. Navas, J. & Martinez-Suarez, J. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Revista Argentina de Microbiología*. 8, (4):224-234.
- López, V.**, Ortiz, S., Corujo, A., López, P., Posa, D., Navas, K., Moreno, R. & Martinez-Suarez, J. (2008). Different Contamination Patterns of Lineage I and II Strains of *Listeria monocytogenes* in a Spanish Broiler Abattoir. *Poultry Science*. 87: 1874-1882.
- Lues, J.**, Theron, M., Venter, P. & Rasephei. (2007). Microbial Composition in Bioaerosols of a High-Throughput Chicken-Slaughtering Facility. *Poultry Science*, 86:142–149.

- Marcy, J.** (2007). Work remains in battle to control *Listeria*. The National Provisioner, February 2007: 86. www.provisioneronline.com
- Mataragas, M.,** Skandamis, P.N. & Drosinos, E.H. (2008). Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. International Journal of Food Microbiology, 126:1-12
- McLauchlin, J.,** Mitchell, R., Smerdon, W. & Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. International Journal of Food Microbiology, 92: 15-33.
- Meira, A.,** (2002). Carne de Frango saudável.
http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=3037&tipo_tabela=negocios&categoria=marketing
- Mena, C.,** Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T. & Gibbs, P. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. Food Microbiology. 21: 213-216.
- Mengert, U. &** Fehlhaber, K. (1996). Effect of premortal stress on the endogenous microbial contamination of broiler carcasses. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift. 109 (1): 28-31.
- Molina, A. &** Tobo, P. (2004). Série – Biologia molecular, Parte 2 – Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. Einstein. 2 (2): 139.
- Mossel, D.,** (1995). Essentials of the Microbiology of foods: A textbook for advanced studies. John Wiley & Sons. Chichester.
- Mulder, R.** (2008). Producing Microbiologically Safe Poultry Products. P O U L T R Y P R O C E S S I N G W O R L D W I D E.
<http://www.wattnet.com/Archives/Docs/599ppwa.pdf?CFID=25710&CFTOKEN=74030876>
- Murphy, N.,** McLauchlin, J., Ohai & C., Grant, K. (2007). Constrution and evaluation of a microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. International Journal of Food Microbiology, 120:110-119.
- National Center for Biotechnology Information [NCBI].** (2009). Polymerase Chain Reaction. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>
- National Center for Biotechnology Information [NCBI].** (2009). Real Time quantitative Reverse Transcription PCR.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml>
- Nichas, G. &** Drosinos, E. (1999). Meat and Poultry Spoilage of Meat In Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press. London. Nijdam E., Arens P., Lambooij E., Decuypere E. & Stegeman J. (2004). Factors influencing bruises and mortality of broilers during catching, transport, and lairage. Poultry Science, 83(9): 1610-1615.

Nollet, L. & Toldrá, F. (2006). Advanced Technologies for Meat Processing. Taylor and Francis. USA.

Northcutt, J. & Russel, S. (2003). General Guidelines for Implementation of HACCP in a Poultry Processing Plant. Bulletin 1155. The University of Georgia, Cooperative Extension Service, College of Agricultural and Environmental Sciences, Department of Poultry Science.

Northcutt, J., Smith, D., Ingram, K., Hinton jr. A. & Musgrove, M. (2007). Recovery of Bacteria from Broiler Carcasses after Spray Washing with Acidified Electrolyzed Water or Sodium Hypochlorite Solutions. Poultry Science. 86:2239–2244.

Office International des Epizooties [OIE] & Center for Food Security and Public Health – Iowa State University. (2005). Listeriosis.
<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/listeriosis.pdf>

O’Grady, J., Sedano – Balbás, S., Maher, M., Smith, T. & Barry, T. (2008). Rapid real – time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on *ssrA* gene, a novel diagnostic target. Food Microbiology, 25: 75-84.

Orndorff, P., Hamrick, T., Smoak, I. & Havell, E. (2006). Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. Veterinary Microbiology, 114: 1-15.

Pamer, E. (2004). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. Nature Reviews Immunology, 4:812-823.

Popowska, M. & Markiewicz, Z. (2006); Characterization of *Listeria monocytogenes* protein Lmo0327 with murein hydrolase activity. Archives of Microbiology, 186:69-86.

Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P. & Cocolin, L. (2008). Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR; International Journal of Food Microbiology, 121: 99-105.

Rebuffo, A., Schmitt, J., Wenning, M., Stetten, F. & Scherer, S. (2005). Reliable and Rapid Identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* Species by Artificial Neural Network – Based Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Applied and Environmental Microbiology, Vol 72, 2:994-1000.

Regulamento (CE) n.º 1/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Dezembro de 2004, relativo à protecção dos animais durante o transporte e operações afins e que altera as Directivas 64/432/CEE e 93/119/CE e o Regulamento (CE) n.º 1255/97.

Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.

Regulamento (CE) n.º 889/2008 da Comissão de 5 de Setembro de 2008 que estabelece normas de execução do Regulamento (CE) n.º 834/2007 do Conselho relativo à produção biológica e à rotulagem dos produtos biológicos, no que respeita à produção biológica, à rotulagem e ao controlo.

Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da Comissão, de 5 de Dezembro de (2007), que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.

Rissi, D., Rech, R., Barros, R., Kommers, G., Langohr, I., Pierezan, F. & Barros, C. (2006). Forma nervosa de listeriose em caprinos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 26(1): 14-20.

Roche, M. & Gracieux, P. (2009). Poor detection of low-virulence field strains of *L. monocytogenes* is related to selective media and is unrelated to *PrfA*. Food Microbiology, 26: 21-26.

Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R. & Bille J. (1986). Acute purulent *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult. Schweizer Medizinische Fortbildungszeitschrift, 116:248–251.

Rodríguez-Lázaro, D.; Jofré, A., Aymerich, T., Hugas, M. & Pla, M. (2004). Rapid Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* by Real-Time PCR. Applied and Environmental Microbiology, vol. 70; No. 10, 6299 – 6301.

Rodríguez-Lázaro, D., Pla M., Scotti M., Monzó, H. & Vázquez-Boland, J. (2005). A Novel Real-Time PCR for *Listeria monocytogenes* That Monitors Analytical Performance via an Internal Amplification Control. Applied and Environmental Microbiology, 71(12): 9008–9012.

Rosenstraus, M., Wang, Z., Chang, S., Debonville, D. & Spadoro, J. (1998) An Internal Control for Routine Diagnostic PCR: Design, Properties, and Effect on Clinical Performance. Journal of Clinical Microbiology. 36(1): 191-197.

Rylander, R., Hsieh V. & Courteheuse C. (1994). The first case of sick building syndrome in Switzerland. Indoor Environmental, 3:159–162.

Rybicki, E. (2001). PCR Primer design and reaction optimisation.
<http://www.mcb.uct.ac.za/manual/pcroptim.htm>

Sergelidis, D. & Abraham, A. (2009). Adaptative Response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. Food Control, 20: 1-10.

Simon, M.; Gray, D. & Cook, N. (1996). DNA Extration and PCR Methods for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Cold – Smoked Salmon. Applied and Environmental Microbiology, Vol 62, Nº 3: 822-824.

Skandamis, P., Yoon, N., Stopforth, J.D., Kendall, P.A. & Sofos, J.N. (2007). Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. Food Microbiology, 25, 294 – 303.

Soares, M., (2008). Avicultura Eficiente: Um Modo de Produção Responsável. Aves e Ovos. Janeiro/Fevereiro.

Socampestre, (2004). Frango de Agricultura Biológica. Socampestre Noticias.
<http://www.socampestre.pt/files/Revistas%20Socampestre/Revista3.pdf>

Swaminathan, B. & Gerner-Smidt, P. (2007). Forum: The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infection, 9: 1236-1243.

Talon, R., Lebert I., Lebert A., Leroy S., Garriga M., Aymerich T., Drosinos E., Zanardi E., Lanieri A., Fraqueza M.J., Patarata L. & Laukova A. (2007). Meat Science. 77: 570–579.

United States Department of Agriculture [USDA], (1999). Generic HACCP Model for Poultry Slaughter. HACCP-5. Revision 1. Washington, D.C.
<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/nis/outreach/models/haccp-5.pdf>

Uyttendaele, M. & Debevere, J., (2006). Chapter 55: Rapid Methods in Food Diagnosis. Handbook of Food Science, Technology and Engineering – Volume 1. Edited by Y.H.Hui. Taylor and Francis. USA.

Valk, H., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., Perra, A., Simon, F., Desenclos, J.C. & Martin P. (2005). Surveillance of *Listeria* infections in Europe. Euro Surveillance, 10 (10): <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=572>

Vazquez-Boland, J., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzales-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 14, No. 3: 584–640.

Veerkamp, C., (1978). The influence of fasting and transport on yields of broilers. Poultry Science, 57 : 634-638.

Veloso, G. (2007). Aves de capoeira. Apontamentos de Inspeção Sanitária II. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

Vierstraete, A. (1999). <http://users.ugent.be/~avierstr/>

Vitas, A., Aguado, V. & Garcia-Jalon, I., (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). International Journal of Food Microbiology. 90: 349-356.

Warriss, P., Bevis, E., Brown, S. & Edwards, J. (1992). Longer journeys to processing plants are associated with higher mortality in broiler chickens. British Poultry Science. 33. 201-206.

Whyte, T. (2002). Occupational exposure of poultry stockmen in current barn systems for egg production in the United Kingdom. British Poultry Science, 43:364–373.

William, T., Hagstad, H., Spangler, E., Hinton, M. & Hughes, K. (1996). Food Safety and Quality Assurance: Foods of Animal Origin. 2nd Edition. Iowa State University Press. Iowa.

Wilson, A., (2005). Wilson's practical meat inspection. 7th Ed. Blackwell Publishing Ltd. UK.

World Health Organization [WHO], (2004). Food and Health in Europe: a new basis for action. WHO Regional Publications European Series, N°96.

Zhu, M.; Mendonça, A., Ismail, H. & Ahn, D. (2008). Effects of Irradiation on Survival and Growth of *Listeria monocytogenes* and Natural Microflora in Vacuum – Packaged Turkey Hams and Breast Rolls. Poultry Science, 87: 2140 – 2145.

